

**Nachweis der Advanced glycation
endproducts (AGEs) im Nierengewebe von
Patienten mit diabetischer Nephropathie
und Amyloidose in Beziehung zum Ausmaß
der Entzündung**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät der
Friedrich-Schiller-Universität Jena

von
Friederike Böttcher
geboren am 16. Dezember 1979 in Zwickau

09.03.2006

Gutachter:

1. Prof. em. Dr. med. G. Stein
2. Prof. Dr. med. H.-J. Gröne
3. Prof. Dr. med. H.-V. Gärtner

Tag der öffentlichen Verteidigung: 06.02.2007

Abkürzungsverzeichnis

AA	Amyloidoseform mit Vorläuferprotein Serumamyloid-A
AEC	Aminoethylcarbazol
ADA	American Diabetes Association
AL	Amyloidoseform mit Immunglobulinleichtketten als Vorläuferprotein
APAAP	Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase
ATTR	Amyloidoseform mit Vorläuferprotein Transthyretin
AVK	Arterielle Verschlusskrankheit
A β ₂ m	Amyloidoseform mit Vorläuferprotein β ₂ -Mikroglobulin
AGE	Advanced glycation endproduct
BSA	Bovines Serumalbumin
CML	N ϵ -Carboxymethyllysine
DN	Diabetische Nephropathie
ELISA	Enzyme-linked immuno sorbent assay
FCS	Fetal calf serum
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
HPLC	High-performance liquid chromatography
IMI	Imidazolon
IL-6	Interleukin 6
KHK	Koronare Herzkrankheit
LDL	Low density lipoprotein
MAP	Mitogen-activated protein
MRP-14	Myeloid-related Protein 14
NF- κ B	Nuclear factor-kappa B
PBS	Phosphate-buffered saline
RAGE	Rezeptor der Advanced glycation endproducts
TNF- α	Tumornekrosefaktor-alpha
WHO	World Health Organization

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	1
2	Einleitung	3
3	Grundlagen	5
3.1.	Amyloidose	5
3.1.1.	Definition	5
3.1.2.	Einteilung	5
3.1.3.	Diagnose	6
3.1.4.	Therapie	7
3.1.5.	Nierenbeteiligung	7
3.2.	Diabetische Nephropathie	7
3.2.1.	Definition	7
3.2.2.	Pathogenese	8
3.2.3.	Stadieneinteilung	9
3.2.4.	Diagnostik und Therapie	10
3.3.	Advanced glycation endproducts	10
3.3.1.	Entstehung und Abbau	10
3.3.2.	Eigenschaften und biochemische Bedeutung	12
3.3.3.	AGEs bei Diabetes mellitus	12
3.3.4.	Therapieoptionen	13
3.3.5.	Advanced glycation endproducts	14
3.3.6.	Rezeptor der AGEs (RAGE)	16
3.4.	Nuclear Faktor- κ B (NF κ B)	16
3.5.	Myeloid-related Protein 14 (MRP-14)	17
4	Fragestellung und Ziele	18

5	Material und Methoden	19
5.1.	Immunhistochemie	19
5.1.1.	Patienten	19
5.1.2.	Untersuchungsmaterial	20
5.1.3.	Pufferlösungen	20
5.1.4.	Entparaffinierung	20
5.1.5.	Immunhistochemische Färbung	21
5.2.	Laborparameter im Serum- und Urin.....	24
5.2.1.	AGE-Bestimmung	24
5.2.2.	Laborparameter.....	26
5.3.	Statistik	27
6	Ergebnisse	28
6.1.	Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchungen	28
6.2.	Routineparameter in Serum- und Urinproben	36
6.3.	AGE-Spiegel in Serum- und Urinproben	38
6.4.	Zusammenhänge zwischen AGE-Konzentration und Laborparametern ..	41
6.5.	Zusammenhang zwischen AGE-Konzentration und Alter	45
6.6.	Vergleich Amyloidose der Niere und diabetische Nephropathie	45
6.7.	Immunhistochemische Untersuchungen in Abhängigkeit von der Nierenfunktionseinschränkung	47
7	Diskussion	49
8	Schlussfolgerungen	62
	Literatur- und Quellenverzeichnis	64
	Anhang	86

Abbildungsverzeichnis

1	Schema der Maillard Reaktion	11
2	Struktur von CML, Pentosidin, Imidazolon und Pyrralin	15
3	Glomerulus eines 48-jährigen Patienten mit diabetischer Nephropathie.....	29
4	Glomerulus eines 60-jährigen Patienten mit Amyloidose AL	30
5	Gefäße und Entzündungsinfiltrate im Interstitium eines 77-jährigen Patienten mit diabetischer Nephropathie.....	31
6	Tubulusepithel bei Amyloidose	32
7	Tubulusepithel bei diabetischer Nephropathie	33
8	MRP-14 positive Zellen im Nierengewebe.....	35
9	MRP-14 positive Zellen im Interstitium bei einer 49-jährigen Patientin mit diabetischer Nephropathie.....	35
10	CML in Serum und Urin	39
11	Imidazolon in Serum und Urin	41
12	Korrelation von CML und Imidazolon im Urin bei allen Patienten	42
13	Korrelation von CML und Imidazolon im Urin bei diabetischer Nephropathie ..	43
14	Korrelation von CML und Imidazolon im Serum bei Amyloidose	44

Tabellenverzeichnis

1	Übersicht wichtiger Amyloidsyndrome	6
2	Stadieneinteilung der diabetischen Nephropathie	9
3	Demographische Angaben zu den Patienten	19
4	Gesamtüberblick der Patienten mit Urin- und Serumanalysen	25
5	Anteil der positiv gefärbten Präparate nach Antikörper und Nierenstruktur	28
6	MRP-14 positive Zellen in 30 Sichtfeldern / Präparat	34
7	Kreatinin im Serum nach Krankheitsbildern	36
8	Kreatinin im Urin nach Krankheitsbildern	36
9	Proteinurie nach Krankheitsbildern	37
10	Albuminurie nach Krankheitsbildern	37
11	CML im Serum nach Krankheitsbildern	38
12	CML im Urin nach Krankheitsbildern	39
13	Imidazolon im Serum nach Krankheitsbildern	40
14	Imidazolon im Urin nach Krankheitsbildern	40
15	Positiv gefärbte Präparate nach Antikörper und Nierenstruktur, DN	45
16	Positiv gefärbte Präparate nach Antikörper und Nierenstruktur, Amyloidose	46
17	Anteil der positiv gefärbten Präparate bei Serumkreatinin $< 200 \mu\text{mol/l}$	47
18	Anteil der positiv gefärbten Präparate bei Serumkreatinin $> 200 \mu\text{mol/l}$	47
19	Korrelationskoeffizienten	48

1 Zusammenfassung

Advanced glycation endproducts (AGEs) werden durch eine nichtenzymatische Glykierung von Proteinen und Peptiden im menschlichen Körper gebildet sowie mit der Nahrung aufgenommen. Sie akkumulieren bei Patienten mit einer chronischen Niereninsuffizienz.

Mittels Immunhistochemie wurden die glykierten Endprodukte N ϵ -Carboxymethyllysin (CML) und Imidazolon in Nierenbiopsiepräparaten von 32 Patienten mit Diabetes mellitus (n=20, männlich 14, weiblich 6, Alter 59 \pm 11,9 Jahre) und Amyloidose (n=12, männlich 7, weiblich 5, Alter 62,8 \pm 11,8 Jahre) dargestellt. Die Expression des Rezeptors der AGEs (RAGE) und des aktivierten Transkriptionsfaktors NF κ B sowie die Infiltration mit MRP-14 positiven Monozyten/Makrophagen wurden ebenfalls immunhistochemisch untersucht.

Mit Hilfe eines kompetitiven ELISA erfolgten die Konzentrationsbestimmungen der beiden AGEs auch im Serum und im Urin. Für Korrelationsuntersuchungen mit dem Serumkreatinin sowie der Ausscheidung von Gesamtprotein, Albumin und Kreatinin im Urin standen die AGE-Spiegel von 25 Patienten zur Verfügung. Diese Gruppe setzte sich aus 20 Patienten mit diabetischer Nephropathie (männlich 16, weiblich 4, Alter 57,6 \pm 9,6 Jahre) und 5 Patienten mit Amyloidose (männlich 1, weiblich 4, Alter 66,6 \pm 7,7 Jahre) zusammen.

Immunhistochemisch wurde eine positive Antikörperreaktion in den Mesangiumzellen, im Interstitium, in Tubulusepithelzellen und in Endothelzellen überprüft.

CML, Imidazolon, RAGE und NF κ B wurden in unterschiedlicher Intensität im Tubulusepithel aller Patienten nachgewiesen. Die tubuläre Basalmembran blieb ausgespart. Innerhalb des Endothels war bei beiden Erkrankungen eine geringere Anfärbung von RAGE nachweisbar. Innerhalb von Interstitium und Mesangium fanden sich leichte Präferenzen von Imidazolon im Interstitium und N ϵ -Carboxymethyllysin im Mesangium. Differenzen bezüglich Alter und Geschlecht konnten in den immunhistochemischen Untersuchungen nicht festgestellt werden.

Der Entzündungsmarker MRP-14 wurde in beiden Patientengruppen geschlechtsunabhängig mit annähernd gleichem Anteil nachgewiesen. Er korrelierte in der Amyloidosegruppe positiv zum Alter und zu den Ablagerungen von NF κ B.

Die Laboruntersuchungen ergaben bis auf die Kreatininausscheidung im Urin (höhere Werte bei Diabetikern) für das Serumkreatinin und die Albumin-/Proteinausscheidung im Urin gleichartige Konzentrationen.

Die CML- und Imidazolonkonzentrationen im Serum waren ähnlich denen von gesunden Kontrollpersonen. Differenzen zwischen Patienten mit einer diabetischen Nephropathie und einer Amyloidose waren bezüglich der AGE-Spiegel nicht feststellbar. Im Serum und Urin wurden für CML annähernd gleiche Konzentrationen gemessen, während Imidazolon höhere Spiegel im Urin zeigte.

In der Gruppe der Diabetiker konnten im Urin positive Korrelationen zwischen den beiden AGEs und dem Gesamtprotein bzw. Albumin festgestellt werden. Des Weiteren bestand eine signifikante Beziehung zwischen CML und Imidazolon im Urin sowie zwischen Imidazolon und Kreatinin im Serum.

Bei den Amyloidosepatienten zeigten sich Zusammenhänge zwischen der CML-Konzentration im Serum und dem Kreatinin, CML und Imidazolon im Serum sowie CML im Serum und Imidazolon im Urin.

Die Konzentrationen von Imidazolon im Serum und im Urin korrelierten mit der Serumkonzentration von Kreatinin. Eine positive Beziehung bestand zwischen dem Patientenalter und der CML-Ausscheidung im Urin.

Insgesamt wurden zwischen Patienten mit diabetischer Nephropathie und mit Amyloidose keine wesentlichen Unterschiede im immunhistochemischen Bild und in den AGE-Konzentrationen nachgewiesen. Beide Erkrankungen wiesen in den Nieren Ablagerungen von CML und Imidazolon auf. Durch die Aktivierung von Entzündungsprozessen und dem damit verbundenen Gewebeumbau könnten die AGEs am Voranschreiten des Nierenfunktionsverlustes beteiligt sein.

2 Einleitung

Neben Erkrankungen des Herz-Kreislaufsystems sowie bösartigen Tumoren zeigen Stoffwechselstörungen die höchsten Morbiditäts- und Mortalitätsraten in Deutschland. Mit der Wohlstandszunahme in den westlichen Ländern entwickelt sich auf dem Boden eines metabolischen Syndroms eine erhöhte Inzidenz von Adipositas, Dyslipoproteinämie, Hyperurikämie, arterielle Hypertonie und Diabetes mellitus.

In Deutschland starben im Jahr 2004 laut Statistischem Bundesamt mehr als 23.600 Personen an den Folgen eines Diabetes mellitus. Die Prävalenz liegt bei ca. 4,5 %. Auf Grundlage der WHO- bzw. ADA-Kriterien wird sie sogar auf 8,5 - 9 % geschätzt (*Hader und Plum 2002*). Mit der Entdeckung des Insulins durch *Banting* und *Best* 1921 wurde die Behandlung des Diabetes mellitus möglich. Heute werden Lebenserwartung und Lebensqualität vorwiegend durch spezifische Komplikationen und Folgeerkrankungen bestimmt. Neben der diabetischen Makroangiopathie treten im Bereich der Nieren, der Augen sowie des peripheren und autonomen Nervensystems Schädigungen der kleinen Gefäße, die diabetische Mikroangiopathie, auf. Die prognostisch ungünstigste Spätkomplikation ist die diabetische Nephropathie, welche weltweit die häufigste Ursache der terminalen Niereninsuffizienz darstellt (*Phillips und Steadman 2002, Caramori und Mauer 2003, Molitch et al. 2003*). In Europa und den USA sind ca. 35 % aller Dialysepatienten an Diabetes mellitus erkrankt.

Wesentliche Parameter, die den Verlauf der diabetischen Nephropathie charakterisieren, sind die Albuminausscheidung im Urin und die glomeruläre Filtrationsrate. Im Stadium der Mikroangiopathie ist eine Frühdiagnostik und unter konsequenter Diabetes- und Blutdrucktherapie eine Rückbildung der Erkrankung möglich.

Bereits im Jahre 1854 beschrieb *Rudolf Virchow* die Proteinspeicherkrankheit Amyloidose. Das fibrilläre Protein Amyloid wird in einem oder mehreren Geweben des Körpers abgelagert und verursacht Funktionsstörungen bis hin zum Organversagen. Häufiges Zielorgan ist neben Leber, Milz und Verdauungstrakt die Niere (*Linke et al. 1998, Merlini und Belotti 2003*). Die am häufigsten vorkommenden Fibrillenproteine bedingen die Einteilung in verschiedene Syndrome, z.B. Amyloidose A, Amyloidose L (Leichtketten) und Amyloidose TTR (Transthyretin). Die Amyloidose AA, welche die häufigste Amyloidoseform ist, entsteht

durch Umformung des Akute-Phasen-Proteins Serumamyloid A und wird folglich vorwiegend durch chronisch entzündliche Erkrankungen hervorgerufen.

Advanced Glycation Endproducts sind wesentlich an der Nierenschädigung bei Diabetes mellitus und wahrscheinlich auch bei der Amyloidose beteiligt (*Raj et al. 2000, Röcken et al. 2003*). Hyperglykämie, oxidativer Stress und Carbonylstress verursachen die Bildung und Ablagerung der AGEs unter anderem im Nervensystem, in den Nieren, Gefäßen, im Auge und in der Haut (*Araki et al. 1992, Kimura et al. 1996, Mizutani et al. 1997, Saxena et al. 2000, Shibata et al. 2000, Dawczynski et al. 2002*). Patienten mit diabetischer Nephropathie, Amyloidose und Niereninsuffizienz zeigen eine verstärkte Akkumulation von AGEs, z.B. Nε-Carboxymethyllysin oder Imidazolone in verschiedenen Geweben und Körperflüssigkeiten (*Degenhardt et al. 1997, Horie et al. 1997, Niwa et al. 1997a, Niwa et al. 1997b, Meng et al. 2000, Uesugi et al. 2000, Röcken et al. 2003*). Ein weiterer Risikofaktor für die Entstehung und Ablagerung der AGEs ist das Alter des Patienten (*Kasper und Funk 2001, Ulrich und Cerami 2001, Vlassara und Palace 2003*). Ein höheres Lebensalter führt zu einem stärkeren oxidativen Stress, zu Proteinumbau und Insulinresistenz und trägt hiermit zu einer erhöhten Inzidenz von Glomerulosklerose, Katarakt, Neoplasien, Osteoporose und Morbus Alzheimer bei. Des Weiteren führen glykierte Endprodukte zum verstärkten Auftreten arteriosklerotischer Veränderungen, die als Mikro- und Makroangiopathie die Nierenfunktion weiter verschlechtern (*Raj et al. 2000, Busch et al. 2004*).

Um die Inzidenz und Progredienz der chronischen Niereninsuffizienz zu verringern, ist es notwendig, den ätiologischen und pathogenetischen Zusammenhang zwischen AGE-Akkumulation und Nierenschädigung zu klären. Mit Hilfe dieser Erkenntnisse kann wahrscheinlich eine wirkungsvolle Prävention, Diagnostik und Therapie betrieben werden. Die Notwendigkeit der Forschung auf diesem Gebiet wird durch die oben genannten Aspekte ersichtlich.

3 Grundlagen

3.1. Amyloidose

3.1.1. Definition

Amyloidosen repräsentieren Speicherkrankheiten, die durch Ablagerung von abnorm gefalteten fibrillären Proteinen, den Amyloiden, gekennzeichnet sind. Durch generalisierte oder lokale, meist extrazelluläre Akkumulation erfolgt eine Vergrößerung und Verhärtung der betroffenen Organe, gefolgt von einer Funktionseinschränkung.

Amyloid ist ein biochemisch uneinheitlicher pathologischer Eiweißkörper mit folgenden Charakteristika (*Linke et al. 1998, Saeger und Röcken 1998*):

- fibrilläre Ultrastruktur mit Fibrillendurchmesser von ca. 10 nm und unterschiedlicher Länge
- Kongorotbildung und grüne Doppelbrechung im polarisierten Licht
- β -Faltblattstruktur, nachweisbar durch Röntgenbeugung, vermittelt Proteinase-resistenz

Jedem Fibrillenprotein kann ein autologes Vorläuferprotein, welches physiologisch im Organismus vorhanden ist, zugeordnet werden. Zusätzlich konnten Apolipoprotein E, Amyloid-P-Komponente, Proteoglykane und Glykosaminoglykane als Bestandteile des Amyloids identifiziert werden (*Kisilevsky 1992, Botto et al 1997, Merlini und Belotti 2003, Yan et al. 2000*).

3.1.2. Einteilung

Bislang wurden 21 verschiedene Fibrillenproteine identifiziert, welche jeweils ein definiertes Amyloidsyndrom verursachen und für die Klassifizierung der Amyloidosen genutzt werden (*Kisilevsky 2000, Merlini und Belotti 2003*). Die häufigsten Syndrome sind in Tabelle 1 zusammengefasst. Eine lokale Akkumulation wird beim Diabetes mellitus (β -Zellen der Langerhans Inseln), Morbus Alzheimer (Alzheimer Plaque), bei medullärem Schilddrüsenkarzinom und im Myokard alter Menschen beobachtet (*Carbonin et al. 1990, Dammacco 1991, Clark et al. 1996, Bayer et al. 1997, Kahn et al. 1999, Cacoub et al. 2000*).

Tabelle 1: Übersicht wichtiger Amyloidsyndrome

Amyloidklasse / Fibrillenprotein	Vorläuferprotein (mit Funktion)	Typischer Organbefall	Ursächliche Erkrankung
AA	Serumamyloid-A (Akutphasenprotein)	Nebennieren, Nieren, Herz, Milz, Leber, Pankreas	<ul style="list-style-type: none"> chronische Entzündungen (z.B. rheumatoide Arthritis) bakteriell (z.B. Tuberkulose) neoplastisch genetisch
AL	Immunglobulin-ketten λ , κ , γ (spezifische Immunabwehr) (Buxbaum 1992)	Darm, periphere Nerven, Skelettmuskulatur, Zunge, Schilddrüse, Herz, Nieren, Lunge, Pankreas, Leber, Milz	<ul style="list-style-type: none"> monoklonale Gammopathien (überwiegend benigne) idiopathisch
ATTR	Transthyretin (Transport des Thyroxins und des retinolbindenden Proteins)	periphere Nerven, Herz, Niere, Lunge, Gelenke	<ul style="list-style-type: none"> genetisch (Punktmutation) senil (Alter)
A β_2 m	β_2 -Mikroglobulin	perineurales und periartikuläres Bindegewebe, Gelenke, Knochen, Haut, Niere (Jadoul et al. 1997)	<ul style="list-style-type: none"> Dialysebehandlung (abhängig von Dauer) (Gejyo et al. 1985)

3.1.3. Diagnose

Um den Verdacht einer Amyloidose zu bestätigen, sind folgende diagnostische Schritte zu beachten:

1. Gewinnung von suspektem Gewebe (bei lokalisierter Amyloidose aus dem Herd selbst, bei systemischer aus Kolon- oder Rektumsubmukosa, subkutanem Fettgewebe, Nierengewebe oder Knochenmark)
2. Formalinfixierung, Paraffineinbettung

3. klassische Kongorotfärbung nach *Puchtler et al. (1962)*: Amyloid wird lichtmikroskopisch rot angefärbt und leuchtet im polarisierten Licht phosphor- oder apfelgrün auf
4. Klassifikation der Amyloidsyndrome mittels Immunhistochemie

3.1.4. Therapie

Abhängig von der Grunderkrankung und dem Organbefall sollte eine kausale Therapie angestrebt werden. Bei den meisten Patienten ist allerdings nur noch eine symptomatische Therapie der Komplikationen möglich.

3.1.5. Nierenbeteiligung

Eine Ablagerung von Amyloid erfolgt glomerulär, mesangial (bevorzugt Amyloid A), im Gefäßsystem der Niere (bevorzugt Amyloid L) sowie tubulointerstitiell, vor allem entlang der tubulären Basalmembran.

Eine Nierenbeteiligung zeigt sich in den Symptomen eines nephrotischen Syndroms und gelegentlich in einer Hypoperfusion der Niere, einer renal tubulären Azidose oder eines Diabetes insipidus (*Scheler et al. 1992*).

3.2. Diabetische Nephropathie

3.2.1. Definition

Unter dem Begriff „diabetische Nephropathie“ werden die Glomerulosklerose, interstitielle Nephritis, Papillennekrosen und verschiedene tubuläre Schäden zusammengefasst, die bei Patienten mit Diabetes mellitus auftreten können.

1936 beobachteten *Kimmelstiel* und *Wilson* morphologische Veränderungen, die als noduläre Glomerulosklerose beschrieben und als diabetesspezifisch angesehen wurden (*Kimmelstiel und Wilson 1936*). Die Leitsymptome Mikroalbuminurie, renale Hypertonie und progrediente

Niereninsuffizienz bedingen kardiale, zerebrale, vaskuläre und infektiöse Komplikationen, die für eine hohe Mortalitätsrate bei Diabetikern verantwortlich sind (*Hader und Plum 2002, Molitch et al. 2003*).

Eine diabetische Nephropathie entsteht bei 30-40 % der Typ-1-Diabetiker und bei Typ-2-Diabetikern bis zum mittleren Manifestationsalter (*Hader und Plum 2002*). Die diabetische Nephropathie ist heute weltweit die häufigste Ursache einer terminalen Niereninsuffizienz (*Phillips und Steadman 2002, Caramori und Mauer 2003, Molitch et al. 2003*).

3.2.2. Pathogenese

In Folge der gestörten Stoffwechsellaage wird die Synthese der glomerulären Basalmembranen quantitativ und qualitativ gestört und führt zu einer Verdickung der Membran (*Berg UB et al. 1998, Dalla Vestra et al. 2000*). Durch eine Verminderung der Elektronegativität und der Permeabilitätssteigerung für Plasmaproteine werden Matrixmoleküle und Immunglobuline in die Mesangiumzellen eingelagert. Die diffuse und noduläre interkapilläre Mesangiumproliferation bedingen eine Sklerose der Glomeruli. Zusätzlich werden eine arterioläre Hyalinose sowie eine Atrophie der Tubuli beobachtet (*Osterby et al. 2002*).

Folgende Faktoren sind für das Auftreten und Fortschreiten der diabetischen Nephropathie verantwortlich (*Kohlhagen und Kelly 2003*):

- genetische Disposition
- schlechte metabolische Kontrolle
- diätetische Faktoren (eiweißreiche, fettreiche oder kochsalzreiche Ernährung)
- arterielle Hypertonie
- Tabakkonsum
- Dysproteinämie

3.2.3. Stadieneinteilung

Die klinische Einteilung der diabetischen Nephropathie erfolgte bisher nach *Mogensen* in fünf Stadien, die jedoch vor allem im Bereich der fortgeschrittenen Nephropathie keine genaue Abgrenzung zulassen. In Anlehnung an die *National Kidney Foundation* wurde eine neue Stadieneinteilung erarbeitet, welche auch in die Praxisleitlinien der Deutschen Diabetes Gesellschaft aufgenommen wurde (*Mogensen et al. 1983, Hasslacher 2002*). Einen Überblick über die Stadien der diabetischen Nephropathie zeigt Tabelle 2.

Tabelle 2 : Stadieneinteilung der diabetischen Nephropathie in Anlehnung an die
National Kidney Foundation (2002)

Stadium	Albumin- urie (mg/l)	Kreatinin- Clearance (ml/min)	Klinik
Nierenschädigung mit normaler Nierenfunktion			<ul style="list-style-type: none"> ▪ Serumkreatinin im Normbereich ▪ Blutdruck im Normbereich oder arterielle Hypertonie ▪ Dyslipidämie ▪ Progression von KHK, AVK, Retinopathie und Neuropathie
a) Mikroalbuminurie	20–200	> 90	
b) Makroalbuminurie	> 200		
Nierenschädigung mit Niereninsuffizienz			<ul style="list-style-type: none"> ▪ Serumkreatinin grenzwertig oder erhöht ▪ arterielle Hypertonie ▪ Dyslipidämie ▪ Hypoglykämieeigung ▪ Progression von KHK, AVK, Retinopathie und Neuropathie ▪ Anämieentwicklung ▪ Störung des Knochenstoffwechsels
a) leichtgradig	> 200	60–89	
b) mäßiggradig		30–59	
c) hochgradig	abnehmend	15–29	
d) terminal		< 15	

3.2.4. Diagnostik und Therapie

Einen Hinweis für das Vorliegen einer diabetischen Nephropathie liefert der mehrfache Nachweis einer Mikroalbuminurie (*Fioretto et al. 2001, Tobe et al. 2002, Molitch et al. 2003, Shumway und Gambert 2003*). Bei Verdacht sollten eine Bestätigung der Diagnose durch weitere Untersuchungen und eine Überprüfung auf vorliegende Begleiterkrankungen (*Deckert 1994*) erfolgen.

Die Therapie der diabetischen Nephropathie umfasst (*Plum und Hader 2002*):

- diätetische Maßnahmen (Verminderung der Eiweißzufuhr)
- optimale Blutzuckereinstellung
- antihypertensive Therapie, insbesondere Blockade des Angiotensin-II (ACE-Hemmer, AT₁-Rezeptorantagonisten)
- Reduktion kardialer Risikofaktoren

3.3. Advanced glycation endproducts (AGEs)

Im Jahre 1912 beschrieb der französische Chemiker *L.C. Maillard* erstmalig die Formation eines gelb-bräunlichen Produkts, welches durch Erhitzen einer Mixtur aus Zuckern und Aminosäuren entstand, und legte damit den Grundstein für die Erforschung der AGEs.

3.3.1. Entstehung und Abbau

Die Aldehydgruppe eines reduzierenden Zuckers (z.B. Glukose) reagiert in einer nichtenzymatischen Reaktion mit der ϵ -Aminogruppe eines Proteins, Lipids oder einer Nukleinsäure (*Nawroth et al. 1999, Singh et al. 2001*). Die entstehenden Schiffischen Basen können in die stabilen, aber noch reversiblen Amadori Produkte umgewandelt werden, welche in Form von Fructosamin und glykiertem Hämoglobin (HbA_{1c}) bestimmt werden können (*Kalousová et al. 2004*). In der letzten Phase der Glykierung entstehen aus diesen Ketoaminen durch Dehydrierung, Kondensation, Oxidation und zyklische Reaktionen die irreversiblen und proteaseresistenten Komplexe der AGEs (*Fu et al. 1994, Glomb und Monnier 1995, Hoshii et al. 1996*). Neben diesem klassischen Weg (siehe Abbildung 1), welcher auch als "Hodge

Pathway” bezeichnet wird, entstehen die glykierten Endprodukte auch durch Autooxidation von Glukose oder aus den reaktiven Zwischenverbindungen Glycoxal, Methylglycoxal und 3-Deoxyglucosom, welche auf allen Stufen der *Maillard*-Reaktion gebildet werden können (Niwa et al. 1997b, Frye et al. 1998, Khalifah et al. 1999). Eine gesteigerte Bildung ist bei oxidativem Stress zu beobachten, welcher seinerseits durch gesteigerte AGE-Akkumulation, Hyperlipidämie und Hyperglykämie verstärkt wird (Baynes und Thorpe 1999, Hofmann et al. 1999a). Die Hauptaufnahmequelle exogener AGEs stellen erhitzte, insbesondere kohlenhydrat-, protein- oder fettreiche Speisen dar (O'Brien und Morrissey 1989, Koschinsky et al. 1997, Vlassara und Palace 2003). Weitere Risikofaktoren sind zunehmendes Alter der Patienten und Nikotinabusus (Cerami et al. 1997, Nicholl und Bucala 1998).

Glykierte Endprodukte binden an spezifische Rezeptoren der Makrophagen und führen zu deren Degradation. Es entstehen lösliche AGE-Peptide, welche über die Nieren durch Filtration, Reabsorption und Metabolisierung ausgeschieden werden (Miyata et al. 1998a). Die Ausscheidung der AGEs ist demzufolge von der Nierenfunktion abhängig. Bei fortgeschrittener Nierenschädigung kommt es zu einer verstärkten Akkumulation der glykierten Endprodukte (Singh et al. 2001).

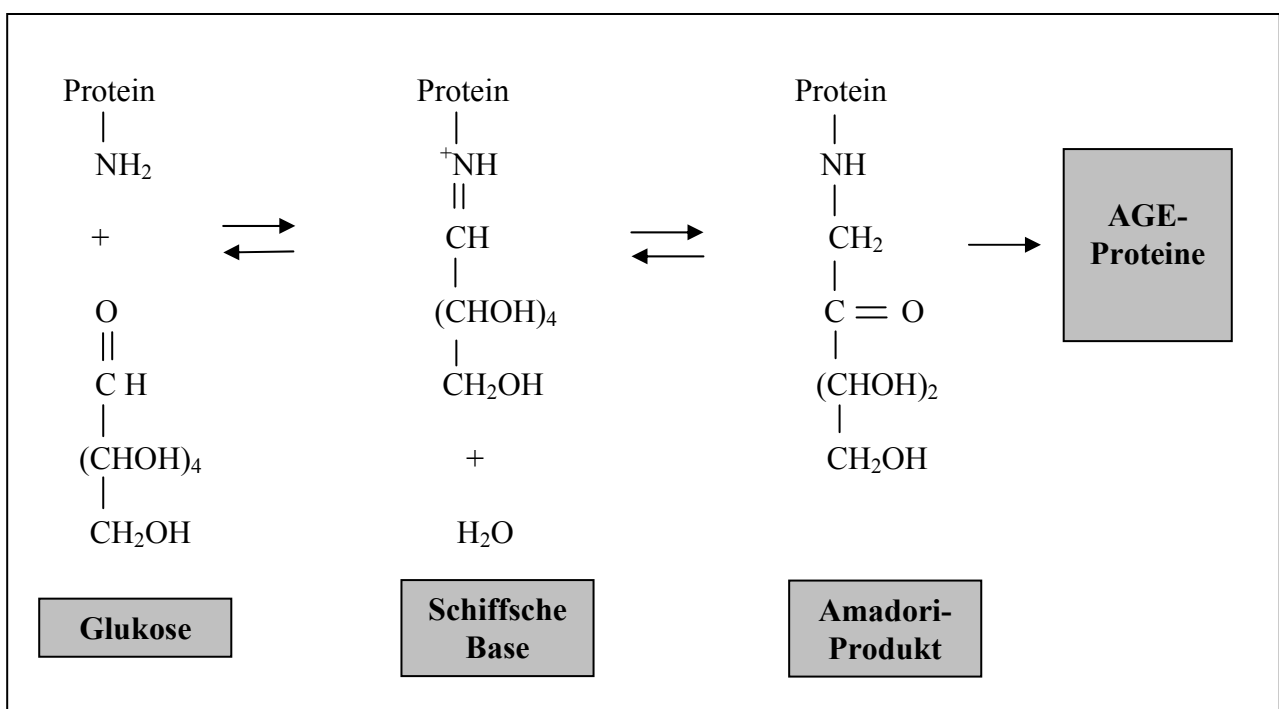


Abbildung 1: Schema der Maillard Reaktion

3.3.2. Eigenschaften und biochemische Bedeutung

Die heterogene Gruppe der AGEs zeichnet sich durch ihre charakteristische gelb-braune Farbe und Fähigkeit zur Fluoreszenz aus. Weitere Merkmale sind verminderte Löslichkeit und Elastizität sowie eine verstärkte Brüchigkeit (*Ulrich und Cerami 2001*). Durch Quervernetzung der Moleküle und Gewebeakkumulation spielen sie eine entscheidende Rolle in der Pathogenese chronischer Erkrankungen. Da die Glykierung langlebiger Proteine bevorzugt wird, findet sich zum Beispiel eine Ablagerung im Kollagengewebe der Haut oder den Kristallen der Augenlinse, wodurch eine Katarakt hervorgerufen werden kann (*Araki et al. 1992, Frye et al. 1998, Stevens 1998*). Besonders im Rahmen neurodegenerativer Erkrankungen, wie Morbus Alzheimer, führen AGEs durch Akkumulation in Amyloidplaques zu einer vermehrten Formation und verminderten Degradation von β -Amyloid sowie zu einem Voranschreiten der Symptomatik.

Im Rahmen der Behandlung einer chronischen Nierenfunktionsstörung mittels Hämodialyse ist eine vermehrte AGE-Modifikation von β_2 -Mikroglobulin zu beobachten, welche pathologische Veränderungen im Binde- und Stützgewebe hervorrufen kann (*Miyata et al. 1993, Niwa 2001*). Rheumatoide Arthritis, idiopathische Lungenfibrose und Arteriosklerose werden durch AGEs ebenfalls negativ beeinflusst.

AGEs besitzen eine hohe biologische Aktivität, welche zu Veränderungen von Struktur und physikochemischen Eigenschaften der betroffenen Makromoleküle sowie zu einer Induktion von intrazellulären Signalmechanismen führt. Der RAGE-Rezeptor, ein Mitglied der Immunglobulinsuperfamilie, stellt einen der gut untersuchten Vermittler für diese Vorgänge dar (*Schmidt et al. 2001, Wendt et al. 2003a, Wendt et al. 2003b*).

3.3.3. AGEs bei Diabetes mellitus

Hauptursachen für die vermehrte Gewebeakkumulation der AGEs bei Diabetes mellitus sind Hyperglykämie und oxidativer Stress, welcher durch Expression inflammatorischer Zytokine hervorgerufen wird (*Krapfenbauer et al. 1998, Bohlender et al. 2005*). Die Komplikationen diabetische Neuropathie, Retinopathie und Nephropathie sind die Folge (*Hammes et al. 1999*). Bei der diabetischen Nephropathie finden sich AGE-Ablagerungen nicht nur in der verdickten Glomeruluskapillarwand sondern auch in der Mesangialmatrix, den nodulären

Läsionen sowie den Arterienwänden (*Horie et al. 1997*). Die Mikro- und Makroangiopathie werden durch erhöhte Vasokonstriktion, durch Modifikation von low-density-Lipoproteinen (LDLs) und einer damit verbundenen Intimaverdickung verstärkt.

3.3.4. Therapieoptionen

Folgende Therapiemöglichkeiten versprechen eine Verbesserung der durch AGE-Akkumulation hervorgerufenen Erkrankungen (*Sano et al. 1998, Khalifah et al. 1999, Nawroth et al. 1999, Raj et al. 2000, Kalousova et al. 2004*):

- Hemmung der Bildung glykierter Endprodukte
 - **Aminoguanidine** behindern die Quervernetzungen in der Spätphase der Maillard-Reaktion
 - **OPB-9195** wirkt ähnlich wie die Aminoguanidine, nur potenter
 - **Pyridoxamine** inhibieren die Konversionsreaktion der Amadori-Zwischenprodukte
 - **Antioxidantien** reduzieren oxidativen Stress
 - **Antihypertensiva**, wie ACE-Hemmer und Angiotensin-II-Rezeptor-Antagonisten, beeinflussen die Bildung reaktiver Vorstufen
 - Kontrolle des Blutglukosespiegels, Verminderung weiterer Risikofaktoren (z.B. Rauchen)
- Zerstörung der AGE-Addukte
 - **N-Phenacetylthiazolium-Bromid (PTB)** durch Aufbrechen von Crosslinks
 - Erhöhung der zellulären Aufnahme und Degradation
- Hemmung der AGE-Rezeptor-Interaktion
 - **lösliches RAGE (sRAGE)** hemmt kompetitiv die Rezeptoren
 - Inhibition der Rezeptorsynthese
- Inhibition der Wirkung an der Zielzelle
 - **Antioxidantien**
 - Inhibition von NFκB

3.3.5. Advanced Glycation Endproducts

Die Endprodukte der nichtenzymatischen Glykierung lassen sich in 2 große Gruppen einteilen, deren Unterschied im möglichen Oxidationsverhalten liegt.

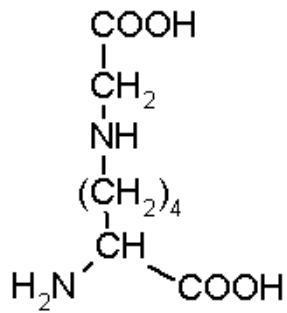
Pentosidin und N ϵ -Carboxymethyllysin sind erfolgreich untersuchte AGEs und entstehen auf dem klassischen Weg der nonenzymatischen Glykierung wie auch durch Autooxidation von Glukose, Prä-Amadori-Produkten sowie Ascorbinsäure (*Ahmed et al. 1986, Glomb und Monnier 1995, Bierhaus et al. 1998, Ando et al. 1999, Nawroth et al. 1999, Singh et al. 2001*). In Anwesenheit von Proteinen kann eine durch Metalle katalysierte Oxidation von ungesättigten Fettsäuren ebenfalls zu einer Pentosidin- und CML-Formation führen (*Fu et al. 1996, Bierhaus et al. 1998, Singh et al. 2001*).

Im Gegensatz dazu entstehen Pyrallin und Imidazolon oxidationsunabhängig (*Uesugi et al. 2000, Singh et al. 2001, Franke et al. 2000*).

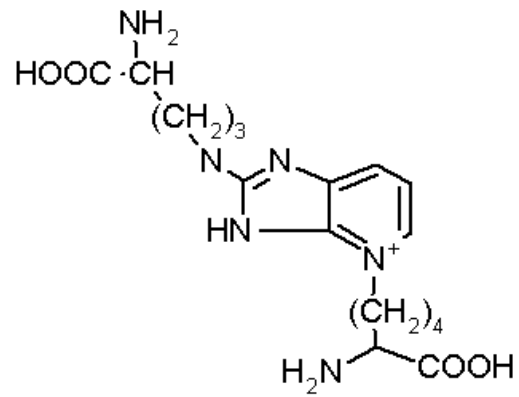
Pyrralin wird im Rahmen einer Reaktion von einem reduzierenden Zucker mit der ϵ -Aminogruppe von Lysin gebildet (*Yoshihara et al. 2001*). Imidazolon ist das Reaktionsprodukt der Guanidinogruppe des Arginins mit 3-Deoxyglucosom, einem hochreaktiven Carbonylpräparat, welches durch multiple Dehydratationen und Rearrangements aus den Amadori Produkten der *Maillard*-Reaktion entsteht (*Niwa et al. 1997b*). Hierbei handelt es sich um ein relativ neues, oxidationsunabhängiges AGE (*Niwa et al. 1997c, Uesugi et al. 2000*).

Der Nachweis von AGEs gelingt zum einen durch immunhistochemische Untersuchungen der betroffenen Gewebe (*Horie et al. 1997, Niwa et al. 1997b, Tanji et al. 2000, Uesugi et al. 2000, Röcken et al. 2003*). Die Konzentration in Körperflüssigkeiten (z.B. Serum, Urin) lässt sich durch immunbiochemische Verfahren, z.B. Gaschromatographie, HPLC (high-performance liquid chromatography), Fluoreszenzspektroskopie oder ELISA bestimmen (*Berg TJ et al. 1998, Galler et al. 2003, Hein et al. 2003*).

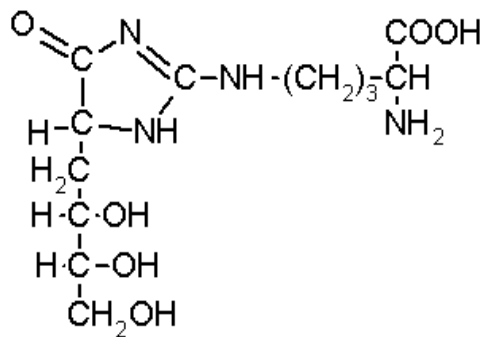
Abbildung 2 zeigt die Strukturformeln der genannten glykierten Endprodukte.



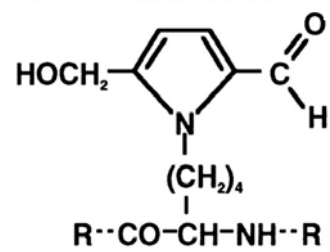
CML



Pentosidin



Imidazolon



Pyrralin

Abbildung 2: Struktur von CML, Pentosidin, Imidazolon und Pyrralin

3.3.6. Rezeptor der AGEs (RAGE)

Der Rezeptor der AGEs ist ein 35-Kilodalton (kD) großes Zelloberflächenprotein, welches als Mitglied der Immunglobulinsuperfamilie verschiedene zelluläre Dysfunktionen hervorrufen kann (*Schmidt et al. 1996, Nawroth et al. 1999*). Er ist ein Multiligand-Rezeptor, der neben den Advanced Glycation Endproducts auch β -Amyloidfibrillen, proinflammatorische Zytokine und Amphoterin bindet, wodurch intrazellulär oxidativer Stress auslöst wird (*Yan et al. 1994a, Schmidt et al. 2001, Stern et al. 2002*). Die AGE-RAGE Interaktion führt zur Transkriptionsstimulation von Genen für Wachstumsfaktoren, Adhäsionsmolekülen und inflammatorischen Zytokinen. Neben einer vermehrten Synthese von Kollagen IV, Fibronectin und Proteoglykanen werden die Zellproliferation, Makrophagenmigration und Plättchenaggregation stimuliert (*Röcken et al. 2003, Kalousová et al. 2004*). Bevorzugte Expressionsorte von RAGE sind Monozyten, Makrophagen, Endothelzellen, Astrozyten, Mikroglia, Perizyten und Podozyten (*Thornalley 1998*).

3.4. Nuclear Transkriptionsfaktor-kappa B (NF κ B)

Der ubiquitär vorkommende NF κ B reguliert die Expression multipler inflammatorischer und immunologischer Gene und spielt damit eine entscheidende Rolle in der Körperabwehr und bei chronischen Entzündungskrankheiten (*Barnes 1997, Mezzano et al. 2001*). Es handelt sich um ein Heterodimer, welches im Zytoplasma inaktiv und im Komplex mit dem inhibitorischen Protein I kappa B vorkommt. Verschiedene endogene und exogene Faktoren, wie oxidativer Stress, DNA-Schäden, Bakterien, Viren und Chemotherapeutika, können die NF κ B-Aktivität induzieren (*Mercurio und Manning 1999*). Durch Interaktion von AGEs, Amyloid- β -Peptiden oder Mitgliedern der S100-Familie mit dem Rezeptor der AGEs (RAGE) werden reaktive Oxidationsprodukte gebildet, die zu einer Aktivierung von NF κ B führen (*Hofmann et al. 1999b, Yan et al. 2000, Deuther-Conrad et al. 2001, Bierhaus et al. 2001*). Eine erhöhte Expression wird in malignen Zellen, bei Atherosklerose, Morbus Crohn und *Listeria monocytogenes* beobachtet (*Bourcier 1997, Ellis et al. 1998, Mansell et al. 2000, Bierhaus et al. 2001*).

3.5. Myeloid-related Protein 14 (MRP-14)

MRP-14 ist ein kalziumbindendes Protein der S100-Protein Familie (S100A9, Calgranulin B), welches im menschlichen Körper einen Heterodimerkomplex mit dem "Myeloid-related Protein" 8 (MRP-8) bildet.

Dieser Komplex wird von Granulozyten, frühen Differenzierungsstufen der Makrophagen (Monozyten) und in geringem Ausmaß auch von entzündungsnahen Epithelzellen exprimiert (*Teigelkamp et al. 1991, Rammes et al. 1997, Hessian et al. 2001, Hobbs et al. 2003*).

Die Funktion der beiden Proteine ist noch nicht vollständig geklärt. Sie umfasst die Zelldifferenzierung, den Ablauf des Zellzyklus, Zytoskelett-Membran-Interaktionen, Phosphorylierung und die Regulation von Kinase-Aktivitäten (*Hessian et al. 1993, Rammes et al. 1997, Melkonyan et al. 1998*). Zusätzlich werden extrazelluläre antifungale, antibakterielle oder chemotaktische Aufgaben beschrieben (*Rammes et al. 1997, Melkonyan et al. 1998, Newton und Hogg 1998*).

Myeloidzellen exprimieren den Heterodimerkomplex unter akuten und chronischen inflammatorischen Bedingungen, z.B. bei rheumatoider Arthritis oder entzündlichen Darmerkrankungen (*Odink et al. 1987, Youssef et al. 1999, Frosch et al. 2000, Stallmach et al. 2004*). Inflammatorische Ereignisse wie chronische Bronchitis, zystische Fibrose oder rheumatoide Arthritis gehen mit erhöhten Serumspiegeln von MRP-8 und MRP-14 einher, wobei in den frühen Entzündungsphasen besonders MRP-14 dominiert (*Roth et al. 1992*).

Diese enge Korrelation ist durch Abgabe von Proteinen aus Leukozyten während der Inflammation zu erklären (*Rammes et al. 1997*).

S100-Proteine sind Liganden des AGE-Rezeptors RAGE (siehe auch S.16, Kapitel RAGE).

4 Fragestellung

Die Schädigung der Niere bis hin zum vollständigen Ausfall der Nierenfunktion mit der Notwendigkeit einer Nierenersatztherapie ist eine schwerwiegende Komplikation von Diabetes mellitus und Amyloidose. Bei beiden Erkrankungen kommt es zu einer Akkumulation von AGEs. Die Beeinflussung der AGE-Akkumulation bzw. der AGE-vermittelten Wirkungen ist ein viel versprechender Therapieansatz

In dieser Arbeit soll die Akkumulation von glykierten Endprodukten innerhalb der Nierenstrukturen untersucht werden. Die daraus gewonnenen Erkenntnisse können Hinweise für das Verständnis des Schädigungsmechanismus der AGEs geben und damit auch bei der Entwicklung entsprechender Therapieverfahren hilfreich sein.

Folgende Sachverhalte sollen betrachtet werden:

1. Bestehen Unterschiede in der Akkumulation der AGEs CML und Imidazolon? In welchem Zusammenhang sind diese Ablagerungen mit der Expression des Rezeptors der AGEs (RAGE) zu sehen?
2. Gibt es einen Zusammenhang zwischen der Ablagerung der AGEs in den Gewebsstrukturen und der Entzündungsaktivität (z.B. NF κ B und MRP-14)?
3. Wie verhalten sich die Konzentrationen von CML und Imidazolon (in Serum und Urin) untereinander und zu anderen Laborparametern?
4. Existieren Zusammenhänge zwischen dem immunhistologischen Bild und den CML- bzw. Imidazolonspiegeln in Serum und Urin?
5. Welche Unterschiede bestehen zwischen den Erkrankungsbildern Amyloidose und diabetische Nephropathie?

5 Material und Methoden

5.1. Immunhistochemie

5.1.1. Patienten

Für die immunhistochemischen Untersuchungen wurden 32 Patienten mit den Diagnosen diabetische Nephropathie (n=20), AA-Amyloidose (n=5) und AL-Amyloidose (n=7) im Alter zwischen 40 und 85 Jahren ausgewählt. *Professor Dr. H.-J. Gröne* (Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg) stellte die Biopsieschnitte von 16 Patienten (diabetische Nephropathie n=14, AL-Amyloidose n=2) zur Verfügung, welche im Zeitraum von 1998-2002 an der Klinik für Innere Medizin IV der Friedrich-Schiller-Universität biopsiert wurden. Die parallel asservierten Urin- und Serumproben dieser Patienten wurden für weitere Untersuchungen genutzt. Die Datenentnahme erfolgte aus den Krankenunterlagen. 16 weitere Nierenbiopsien des Zeitraums 1995-2002 wurden von Frau *Professor Dr. H.-V. Gärtner* (Institut für Pathologie, Eberhard-Karls-Universität Tübingen) zur Verfügung gestellt (diabetische Nephropathie n=6, AA-Amyloidose n=5, AL-Amyloidose n=5). Die 5 Patienten mit Amyloidose AA und die 7 Patienten mit Amyloidose AL wurden zu einer Gruppe zusammengefasst. Einen Überblick über die Patienten bezüglich Anzahl, Diagnose, Geschlecht sowie Alter zum Zeitpunkt der Biopsieentnahme gibt Tabelle 3.

Tabelle 3: Demographische Angaben zu den Patienten

Gruppe	Personenzahl			Alter		
	gesamt	Männer	Frauen	Mittelwert (\pm Standardabweichung)		
	gesamt			gesamt	Männer	Frauen
gesamt	32	21	11	60,4(\pm 11,8)	60,4(\pm 11,0)	60,4(\pm 13,8)
DN	20	14	6	59,0 (\pm 11,9)	58,9(\pm 11,7)	59,2(\pm 13,4)
Amyloidose gesamt	12	7	5	62,8(\pm 11,8)	63,4(\pm 9,6)	61,8(\pm 15,6)
AA-Amyloidose	5	3	2	65,6(\pm 16,5)	65,7(\pm 12,9)	65,5(\pm 27,6)
AL-Amyloidose	7	4	3	61,8(\pm 8,1)	59,3(\pm 9,3)	60,7(\pm 8,0)

5.1.2. Untersuchungsmaterial

Als Untersuchungsmaterial für die immunhistochemischen Färbungen dienten Paraffinschnitte der Niere, die zur Diagnosesicherung und Therapieplanung von einem Zylinder durch perkutane Biopsie gewonnen wurden. Die Schnitte wurden mittels immunhistochemischer Färbemethoden auf den Nachweis von MRP-14, NF κ B, CML, Imidazolon sowie des Rezeptors der AGEs (RAGE) untersucht. Die quantitative Bestimmung der Serum- und Urinkonzentrationen der AGEs N ϵ -Carboxymethyllysine und Imidazolon erfolgte in jeweils 25 Urin- und Serumproben durch ELISA-Technik

5.1.3. Pufferlösungen

Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS) wird in der Immunhistochemie für Waschbäder, als Spüllösung und Verdünnungsmedium, besonders für Methoden mit Peroxidase eingesetzt. Zur Herstellung der Stammlösung werden 2 g Kaliumchlorid, 2 g Kaliumdihydrogenphosphat, 80 g Natriumchlorid und 12 g Dinatriumhydrogenphosphat in einem Liter Aqua dest. gelöst. Durch Verdünnung mit destilliertem Wasser im Verhältnis 1:10 entsteht ein PBS-Puffer mit dem pH-Wert 7,4.

Für die immunhistochemische Färbung von RAGE wird ein Trispuffer mit einem pH-Wert von 7,5 verwendet. Für eine 0,5 M Stammlösung (10x) werden 60,57 g Tris in 500 ml Aqua dest. gelöst und mit 1 N Salzsäure (400 ml) unter Überprüfung des pH-Wertes gemischt. Anschließend wird die Lösung mit Aqua dest. auf 1000 ml aufgefüllt. Für die Verwendung des Puffers (1:10) wird mit 0,9 % Natriumchlorid verdünnt.

Zur Herstellung des Citratpuffers (pH-Wert 6,0) für die hitzeinduzierte Antigendemaskierung werden 0,1 M Citronensäure (1,8 ml) und 0,1 M Natriumcitrat (8,2 ml) gemischt und in einer Plastikkuvette mit Aqua dest. auf 100 ml aufgefüllt.

5.1.4. Entparaffinierung

Eine vollständige Entparaffinierung ist für die sichere Bindung des Primärantikörpers am Antigen und damit für eine spezifische Anfärbung notwendig. Die Schnitte wurden vorbereitend über Nacht bei 35 °C im Wärmeschrank inkubiert. Zur Entfernung des Paraffins wurden sie jeweils für 10 Minuten in Xylol, anschließend für 2 x 2 Minuten in 100 %

Ethanol, 96 % Ethanol und abschließend für jeweils 2 Minuten in 80 % Ethanol, 70 % Ethanol und Aqua dest. gestellt.

5.1.5. Immunhistochemische Färbung

Nε-Carboxymethyllysin

Nach vollständiger Entparaffinierung und ausreichender Spülung mit Aqua dest. schlossen sich folgende Arbeitsschritte an:

1. Hitzeinduzierte Antigendemaskierung

Die Schnitte wurden in der Mikrowelle bei 800 Watt für 4 x 5 Minuten in Citratpuffer gekocht. Zusätzliche, mit Aqua dest. gefüllte Küvetten sowie ein entsprechendes Auffüllen in den Pausen verhinderten ein Austrocknen.

2. Abkühlung

Die Präparate wurden für mindestens 30 Minuten in Citratpuffer abgekühlt, anschließend getrocknet, mit einem Fettstift (DAKO) umrandet sowie mit PBS-Puffer gespült.

3. Deaktivierung der endogenen Peroxidase

Sie erfolgte mit 3 % Wasserstoffperoxid für 10 Minuten bei Raumtemperatur.

4. Normalserumblockierung

Nach PBS-Spülung wurden die Schnitte für 20 Minuten mit Normalserum blockiert. Hierbei handelt es sich um das Serum einer Tierspezies, welche nicht mit dem nachzuweisenden Antigen immunisiert wurde. Diese Spezies besitzt also keine spezifischen Antikörper gegen die gesuchten Antigene und dient damit der Verhinderung von unspezifischen Anfärbungen durch Absättigung von elektrostatischen Ladungen der Proteine (*Noll und Schaub-Kuhnen, 2000*). Bei der CML-Anfärbung wurde hierfür ein Vectastain-Rabbit-Kit verwendet.

5. Antikörper

Nach PBS-Spülung erfolgte die Inkubation der Schnitte über Nacht bei 4 °C mit einem polyklonalen Antikörper gegen CML, welcher von der Roche Diagnostics GmbH für Forschungszwecke zur Verfügung gestellt wurde.

Mittels Probepräparaten wurde ein optimales Färbeergebnis bei einer Verdünnung des CML-Antikörpers von 1:5000 ermittelt, welche dann bei allen 32 Biopsien genutzt wurde. Bei jedem Ansatz wurde als Negativkontrolle ein Präparat mit bekannter Amyloidose bzw. diabetischer Nephropathie mitgeführt, welches mit 1 % BSA (bovine serum albumin) inkubiert wurde.

Als Färbemethode diente die indirekte Avidin-Biotin-Komplexmethode. Um unspezifische Bindungen auszuschließen, wurde endogenes Biotin blockiert. 4 Tropfen Avidin bzw. Biotin (Vectastain-A-B-Blocking-Kit) wurden in 1000 μ l fetalem Kälberserum (FCS) gelöst, auf die Schnitte pipettiert und jeweils für 15 Minuten bei Zimmertemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Präparate jeweils für 30 Minuten mit biotinyliertem Sekundärantikörper und ABC-Reagenz (mindestens 30 Minuten vorher angesetzt) aus dem Rabbit-Kit-System versetzt. Zwischen den einzelnen Schritten war eine gründliche Spülung mittels PBS wichtig. Als Chromogen diente Aminoethylcarbazol (AEC). Zur Herstellung der Färbesubstanz wurden 0,1 M Essigsäure (2,1 ml) und 0,1 M Natriumacetat (7,9 ml) gemischt, wovon 500 μ l verworfen wurden. Anschließend wurden 4 μ g AEC in 500 μ l Dimethylformamid gelöst und hinzugefügt. Die Lösung wurde mittels Mikrofilter (Porengröße 0,45 μ m) filtriert, so dass eine optisch klare Substanz entstand, welche lichtgeschützt aufbewahrt wurde. Kurz vor Färbung der Präparate erfolgte die Zugabe von 30 % Wasserstoffperoxid (5 μ l). Die AEC-Lösung wurde aufpipettiert und nach 10 Minuten mit PBS gespült. Es erfolgte eine Gegenfärbung der Kerne mit Hämalaun für 4 Minuten. Im Anschluss wurden die Schnitte für 10 Minuten unter fließend kaltem Leitungswasser gewässert und mit Kaisers Glyceringelantine eingedeckt.

Imidazolon

Die Anfärbung von Imidazolon erfolgte analog der des CML. Anstelle des Vectastain-Rabbit-Kits wurde ein Mouse-Kits verwendet. Demzufolge wurden als Vorbereitung der Blockierung Avidin und Biotin in 1000 μ l 10 % Ziegenserum gelöst.

Als Primärantikörper diente ein monoklonaler Antikörper, der für Forschungszwecke von T. Niwa (Nagoya Universität, Japan) zur Verfügung gestellt wurde (*Niwa et al. 1997c*).

Myeloid-related Protein 14

Eine optimierte Antigenfreilegung erfolgte durch Andau der Präparate mittels Protease XXIV (26 mg in 60 ml erwärmtem Aqua dest. gelöst). Die Schnitte wurden bei 37 °C für 10 Minuten in dieser Lösung inkubiert. Der Andauprozess wurde anschließend 3x mit absolutem Alkohol abgestoppt. Dieser Schritt war durch den sonst weiter voranschreitenden Proteaseandau und die damit verbundene Zerstörung des Gewebes erforderlich. Nach Deaktivierung der endogenen Protease und Blockierung mit Normalserum (Vectastain-ABC-Mouse-Kit) erfolgte die Zugabe des monoklonalen Primärantikörpers gegen MRP-14 im Verhältnis 1:20 (Zwadlo *et al.* 1988, Teigelkamp *et al.* 1991). Die Negativkontrolle wurde mit 1 % BSA versetzt und gemeinsam mit den anderen Präparaten bei 4 °C über Nacht inkubiert. Für die Blockierung des Biotins wurden bei der Färbung von MRP-14 jeweils 4 Tropfen Avidin bzw. Biotin in 1000 µl 10 % Ziegen Serum gelöst. Die Schnitte wurden jeweils 15 Minuten mit den beiden Substanzen und danach für jeweils 30 min mit biotinyliertem Sekundärantikörper und ABC-Reagenz aus dem Vectastain-Mouse-Kitsystem inkubiert. Im Anschluss erfolgte die AEC-Färbung, Hämalaun-Gegenfärbung und Eindeckung mit Glyceringelantine.

Nuclear Faktor-κB

In Anlehnung an die Anfärbung von CML erwies sich eine Vorbehandlung der Präparate mittels Mikrowelle und eine Deaktivierung der endogenen Peroxidase von Vorteil. Zur Verhinderung unspezifischer Anfärbungen wurden die Schnitte für 20 min mit fetalem Kälberserum (FCS) blockiert. Die mit Primärantikörper im Verhältnis 1:20 versetzten Präparate und die Negativkontrolle (1 % BSA) wurden über Nacht bei 4 °C inkubiert.

Die Blockierung des endogenen Biotins erfolgte unter Zuhilfenahme des A-B-Blocking-Kits und FCS. Als biotinylierter Sekundärantikörper wurde Ziegen-Anti-Maus-Antikörper (1:50 mit 1 % BSA) für 45 Minuten auf die Schnitte pipettiert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit horseradish-peroxidase-konjugiertem Streptavidin (1:200 in 1 % BSA, 45 Minuten bei Raumtemperatur) sowie die AEC-Färbung, Gegenfärbung und Eindeckung mit Glyceringelantine.

RAGE

Nach vollständiger Entparaffinierung und Antigendemaskierung (Mikrowelle) wurde bei der Färbung des Rezeptors der AGEs für alle Spülschritte anstelle von PBS ein Trispuffer verwendet. Um unspezifische Hintergrundfärbungen zu minimieren, erwies sich eine Inkubation der Schnitte für 20 Minuten mit 4 %iger Magermilch (in Trispuffer gelöst) als vorteilhaft. Anschließend erfolgte die Blockierung der Präparate für 20 Minuten mit Normalserum aus dem Vectastain-Alkaline-Phosphatase-Universal-Kit. Das Serum wurde entfernt und die Schnitte mit RAGE im Verhältnis 1:50 bzw. mit 1 % BSA (Negativkontrolle) über Nacht bei 4 °C inkubiert (*Bierhaus et al. 2001, Srikrishna et al. 2002*). Für die Blockierung von endogenem Biotin diente 10 % Ziegen Serum als Verdünnungsmedium. Im Anschluss wurden die Präparate für jeweils 30 Minuten mit biotinyliertem Universal-Sekundärantikörper und ABC-Alkalische-Phosphatase-Reagenz aus dem entsprechenden Kitsystem inkubiert.

Für ein spezifisches Färbeergebnis wurde Neufuchsin, das Färbesubstrat für die Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase (APAAP), verwendet. Unmittelbar vor Gebrauch erfolgte hierfür die Mischung von Natriumnitrit (180 mg), Aqua dest. (3750 µl) und Neufuchsin-Stammlösung (300 µl). Dieser Lösung wurden 75 ml Trispuffer (pH 8,7), 40 mg Naphtol AS-BI Phosphat (in 1000 µl Dimethylformamid gelöst) und 95 mg Levamisol hinzugegeben. Nach Überprüfung des pH-Wertes (8,2 bis 8,7) wurde das Substrat filtriert. Die Inkubation der Schnitte erfolgte unter Schütteln für 30 Minuten lichtgeschützt in dieser Flüssigkeit. Nach anschließender Spülung mit Aqua dest., Gegenfärbung mit Hämalun und 10 Minuten Wässerung wurden die Präparate in Kaisers Glycingelantine eingedeckt.

5.2. Laborparameter im Serum und Urin

5.2.1. AGE- Bestimmung

Die Bestimmung der Konzentration der beiden AGEs Imidazolon und Nε-Carboxymethyllysin erfolgte in Proben von 25 Patienten, die bis zum Untersuchungszeitpunkt

bei -80 °C aufbewahrt wurden. Als Vergleichswerte dienten die CML- und Imidazolonkonzentrationen von 45 bzw. 48 gesunden Personen.

Einen Überblick über Anzahl, Geschlechtsverteilung und Alter zum Zeitpunkt der Serum- und Urinabnahme gibt Tabelle 4.

Tabelle 4: Gesamtüberblick der Patienten mit Urin- und Serumanalysen

Gruppe	Personenzahl			Alter		
	gesamt	Männer	Frauen	Mittelwert (\pm Standardabweichung)		
				gesamt	Männer	Frauen
gesamt	25	17	8	59,4(\pm 9,8)	58,4(\pm 9,7)	61,4(\pm 10,4)
DN	20	16	4	57,6(\pm 9,6)	57,8(\pm 9,7)	56,5(\pm 10,5)
Amyloidose gesamt	5	1	4	66,6(\pm 7,7)	68,0(\pm 0)	66,3(\pm 8,8)
AA-Amyloidose	2	1	1	71,5(\pm 5,0)	68,0(\pm 0)	75,0(\pm 0)
AL-Amyloidose	3	0	3	63,3(\pm 8,1)	0	63,3(\pm 8,1)

Für die Konzentrationsbestimmung stand ein kompetitives ELISA-System (Roche Diagnostics GmbH) zur Verfügung. Vor der Messung wurden jeweils 10 μ l der Proben mit einer Proteinase-K-Lösung (1,1 mg Proteinase K pro ml Waschpuffer) vorbehandelt und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Durch 30-minütigem Zusatz von 100 μ l PMSF-Lösung (350 μ l Phenylmethylsulfonylfluorid pro ml Waschpuffer) wurde die Proteinverdauung gestoppt. Diese Vorbehandlung verdünnte die Serum- und Urinproben auf das Verhältnis 1:21.

N ϵ -Carboxymethyllysin

Folgende Arbeitsschritte waren für eine Konzentrationsbestimmung notwendig:

- eine mit Streptavidin beschichtete Mikrotiterplatte (96 Wells) wurde mit biotinyliertem glykierten BSA (5 μ l je ml Inkubationspuffer, davon 100 μ l je Well) beladen und 1 h unter Schütteln bei Raumtemperatur inkubiert

- dreimaliges Waschen (Waschmedium 1:10 mit Aqua dest. verdünnt)
- Zugabe von 50 μl vorbehandelter Probe- bzw. Standardlösung und 50 μl Antikörperkonjugat (horseradish-peroxidase-konjugierter monoklonaler Maus-Anti-CML-Antikörper, 0,7 μl je ml Inkubationpuffer), eine Stunde bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert
- dreimaliges Waschen
- Zusatz von 100 μl ABTS-Natriumperborat-Substratlösung (ABTS[®]: 2,2-Azino-di[3-ethylbenzthiazolin sulfonat] diammoniumsalz), 30 Minuten bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert
- Messung der Extinktion bei 405 nm

Imidazolon

Analog dem CML-ELISA erfolgte eine Beladung der Mikrotiterplatten, dreimaliges Waschen und ein Zusatz von 50 μl Probe bzw. Standard sowie 50 μl Imidazolon-Antikörper (1:2000), welcher über Nacht bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert wurde (*Niwa et al. 1997c*). Nach dreimaligem Waschen wurden die Proben für eine Stunde mit peroxidase-konjugiertem Ziegen-Anti-Maus-Antikörper (100 μl je Well; 1:2000) inkubiert. Anschließend erfolgten Waschen, gründliches Ausklopfen, Zugabe von ABTS und Extinktionsmessung bei 405 nm .

5.2.2. Laborparameter

Kreatinin im Serum

Im Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsdiagnostik der Friedrich-Schiller-Universität Jena wurden die Kreatininkonzentrationen der 25 Patienten mit Hilfe der *Jaffé*-Methode im Serum und Urin bestimmt (*Keil 2000*). Der Referenzbereich reicht im Serum bei Frauen bis 88 $\mu\text{mol/l}$ und bei Männern bis 102 $\mu\text{mol/l}$. Im Urin liegen die Normwerte zwischen 8-26,5 $\mu\text{mol/l}$.

Proteine im Urin

Methode der Wahl für die quantitative Bestimmung des Gesamtproteingehaltes im Urin (Referenzbereich $< 150 \text{ mg/l}$) war die Biuret-Methode (*Keil 2000*).

Außerdem wurde bei allen Patienten der Albumingehalt im Urin (in mg/l) unter Verwendung eines Enzyme Immuno Assay der Firma Beckmann gemessen.

5.3. Statistik

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit dem Computerprogramm SPSS® (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Da eine Normalverteilung der Messwerte nicht vorhanden war, wurden nichtparametrische Verfahren verwendet. Zur statistischen Absicherung von Mittelwertsunterschieden zwischen verschiedenen Gruppen wurden der *Mann-Whitney-U-Test* und der *Kruskal-Wallis-Test* genutzt. Zur Überprüfung der Häufigkeitsverteilung kam der *Chi-Quadrat-Test* zur Anwendung. Die Unterschiede der AGE-Konzentrationen in Serum und Urin wurden mit dem *Wilcoxon-Test* überprüft. Zusammenhänge zwischen den ermittelten Parameter wurden mit Hilfe des Korrelationskoeffizienten nach *Spearman* untersucht.

6 Ergebnisse

6.1. Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchungen

CML und Imidazolon (IMI) sowie deren Rezeptor RAGE und der Transkriptionsfaktor- κ B (NF- κ B) konnten in allen Präparaten dargestellt werden. Bei beiden Patientengruppen wurde eine Anfärbung von Tubulusepithel, Endothelzellen, Interstitium und Mesangiumzellen beobachtet.

Tabelle 5 gibt einen Überblick über den Anteil der positiv gefärbten Präparate bei 32 Patienten unter Berücksichtigung der verwendeten Antikörper (in %).

Tabelle 5: Anteil der positiv gefärbten Präparate nach Antikörper und Nierenstruktur (n=32)

	CML	IMI	NF κ B	RAGE
Tubulusepithel	100	100	100	100
Endothelzellen	100	100	100	40
Interstitium	57,1	87,5	74,1	84,6
Mesangiumzellen	82,1	57,7	41,4	27,6

Eine Anfärbung des Tubulusepithels gelang in allen untersuchten Präparaten.

Eine positive Reaktion im Bereich der Endothelzellen konnte unter Verwendung von CML, Imidazolon sowie NF κ B in allen Fällen festgestellt werden. Der Rezeptor der AGEs zeigte nur in einem Teil der Präparate (40 %) eine Anfärbung der Endothelzellen.

Weiterhin wurde eine positive Darstellung im Interstitium (z.B. innerhalb von Entzündungsinfiltrationen und Gefäßen) und Mesangiumzellen, allerdings in unterschiedlichem Ausmaß, beobachtet.

Mittels *Chi-Quadrat-Test* wurde kein statistisch signifikanter Unterschied bezüglich der immunhistologischen Befunde bei den beiden Diagnosen bzw. dem Geschlecht ermittelt.

Die mitgeführte Negativkontrolle zeigte für alle Untersuchungen kein positives Farbergebnis.

Die Abbildungen 3 - 7 zeigen eine positive Anfärbung bei Amyloidose und Diabetes mellitus unter Verwendung von CML, Imidazolon, NFκB, RAGE.

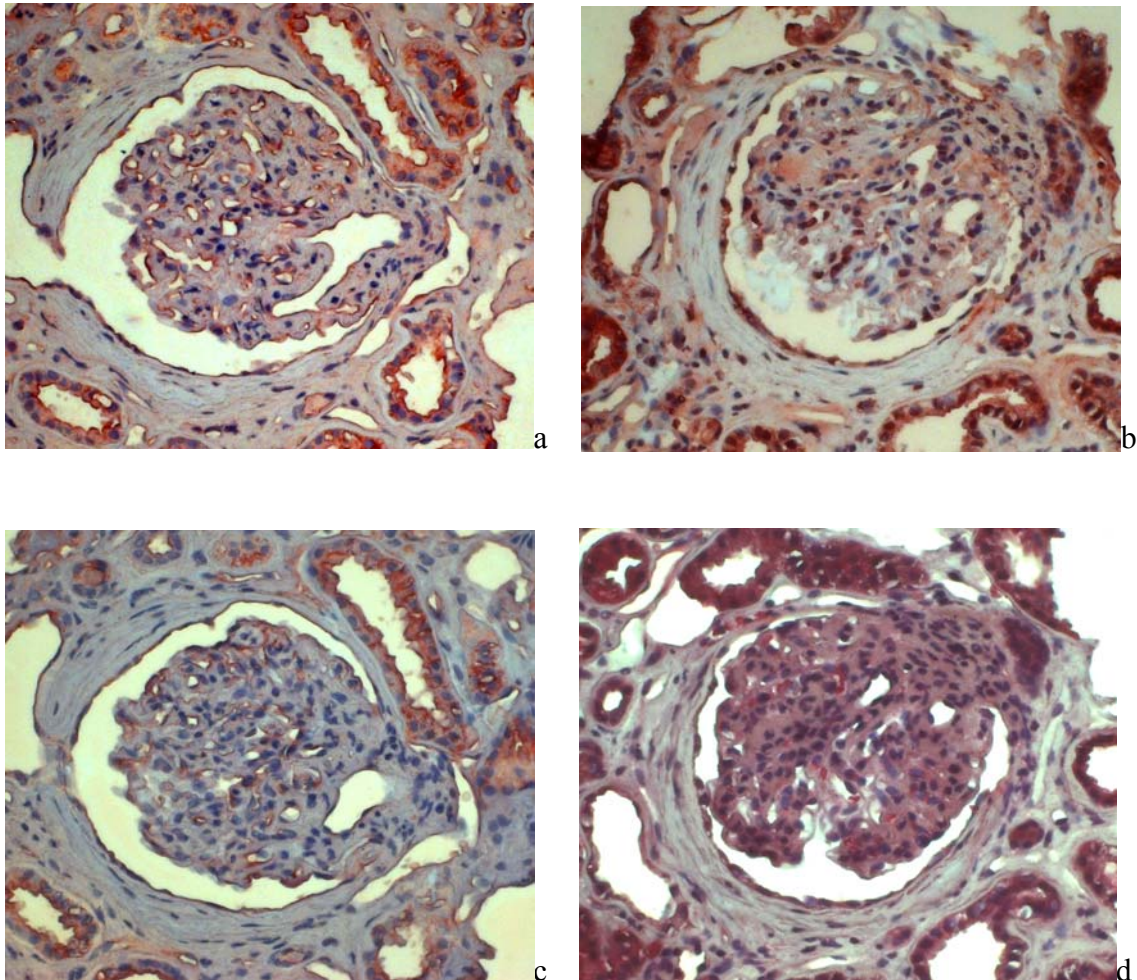


Abbildung 3: Glomerulus eines 48-jährigen Patienten mit diabetischer Nephropathie, 200fach vergrößert

a - CML, b - Imidazolon, c - NFκB, d - RAGE

Mit allen 4 Antikörpern konnte innerhalb des Glomerulus eine Anfärbung von Endothel- und Mesangialzellen (NFκB) bzw. diffus im Interstitium (z.B. Imidazolon) festgestellt werden. Angrenzende Tubulsepithelien sind ebenfalls positiv.

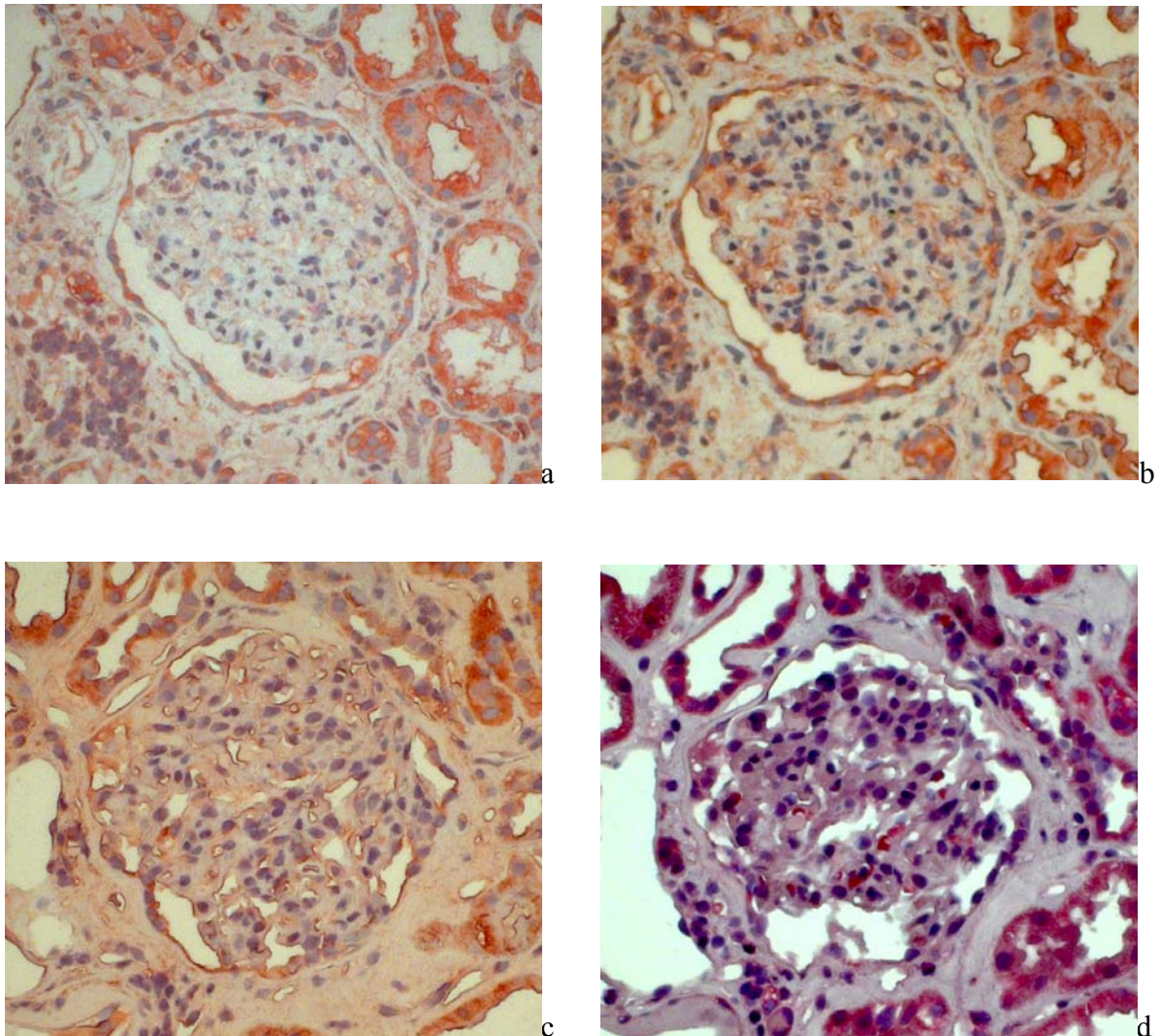


Abbildung 4: Glomerulus eines 60-jährigen Patienten mit Amyloidose AL, 200fach vergrößert

a - CML, b - Imidazolon, c - NFκB, d - RAGE

Innerhalb des Glomerulus ist eine positive Färbung von Mesangialzellen und Endothelzellen erkennbar. Angrenzende Tubulusepithelien sind in den 4 Ausschnitten ebenfalls positiv für CML, Imidazolon, NFκB und RAGE.

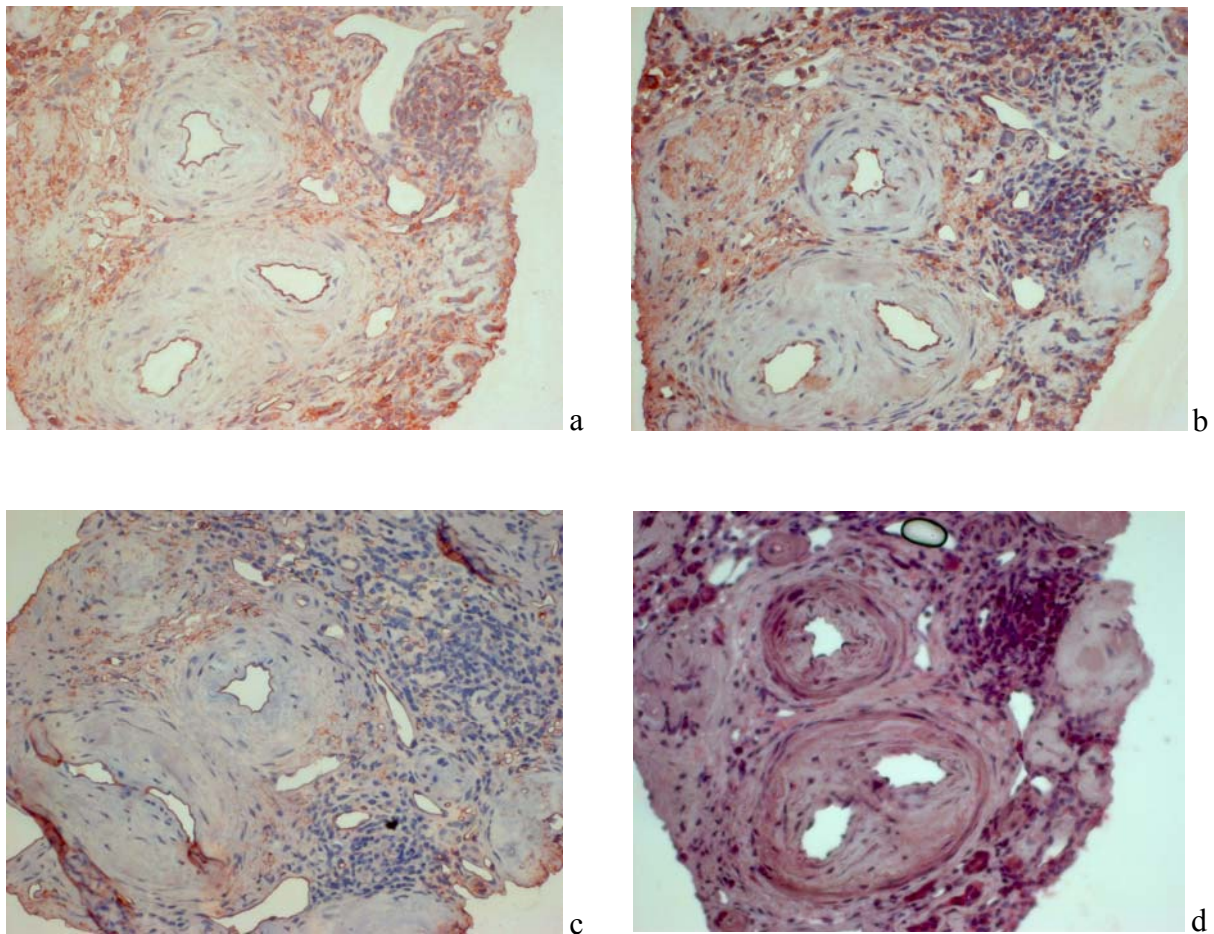


Abbildung 5: Interstitium mit Gefäßen und Entzündungsinfiltrationen im Nierengewebe eines 77-jährigen Patienten mit diabetischer Nephropathie, 200fach vergrößert

a - CML, b - Imidazolon, c - NFκB, d - RAGE

Das Endothel der Gefäße ist für CML, Imidazolon und NFκB deutlich positiv, während RAGE keine Anfärbung zeigt. Unter Verwendung von CML, Imidazolon und RAGE erfolgt eine deutlich positive Reaktion im Bereich der Entzündungsinfiltrate. NFκB ist in diesem Bereich nur schwach positiv.

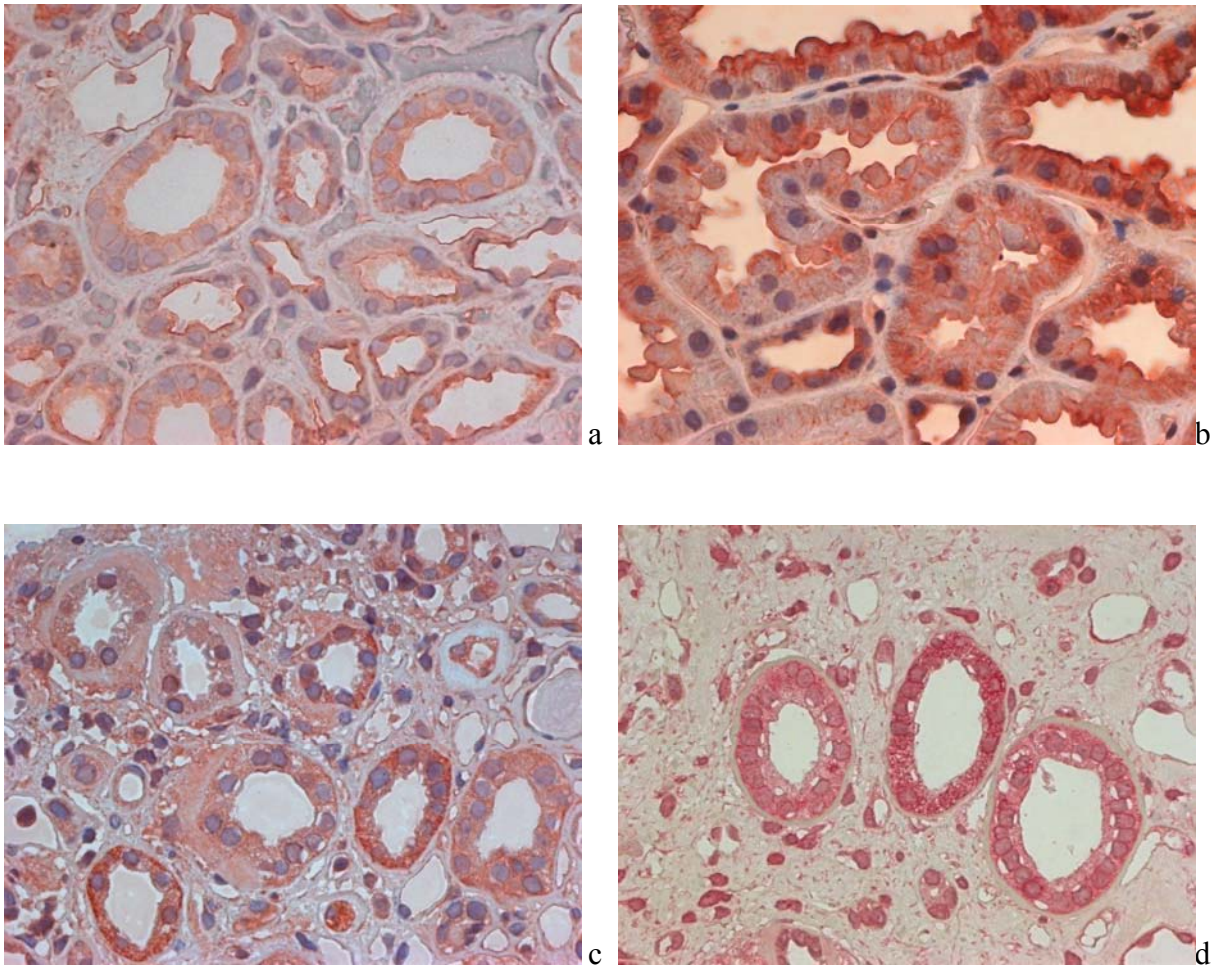


Abbildung 6: Tubulusepithel, 400fach vergrößert, Amyloidose

- a - CML bei einem 51-jährigen Patienten
- b - Imidazolone bei einer 67-jährigen Patientin
- c - NFκB bei einer 46-jährigen Patientin
- d - RAGE bei einer 46-jährigen Patientin

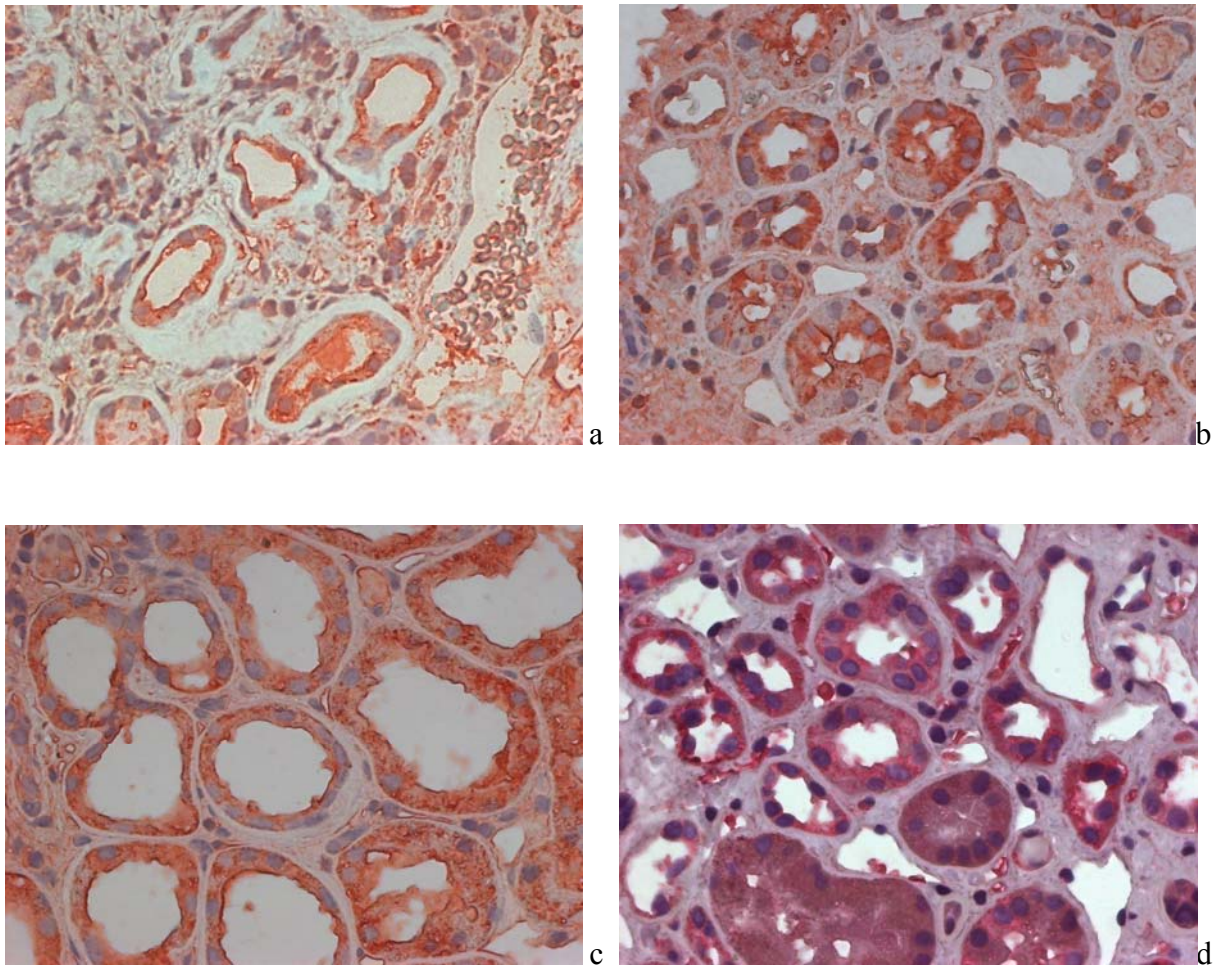


Abbildung 7: Tubulusepithel, 400fach vergrößert, diabetische Nephropathie

- a - CML bei einem 70-jährigen Patienten
- b - Imidazolone bei einem 70-jährigen Patienten
- c - NFκB bei einer 49-jährigen Patientin
- d - RAGE bei einem 70-jährigen Patienten

Beide Krankheitsbilder zeigen eine auffällige Aussparung der Anfärbung im Bereich der tubulären Basalmembran.

Myeloid-related Protein 14

Ein weiteres Anliegen der immunhistochemischen Untersuchungen war die Darstellung des Entzündungsmarkers MRP-14 und die Beziehung zum Anteil der positiv gefärbten Entzündungsinfiltrate im Interstitium. Die Anzahl der MRP-14 positiven Zellen wurde in jeweils 30 Sichtfeldern eines Präparates bestimmt. Tabelle 6 zeigt die Ergebnisse in Abhängigkeit von der Diagnose.

Eine statistisch relevante Differenz zwischen beiden Erkrankungsbildern konnte nicht festgestellt werden. Die Abweichungen zwischen beiden Diagnosen unter Berücksichtigung des Geschlechts erwiesen sich nach dem *Mann-Whitney-U-Tests* als nicht signifikant ($p=0,063$).

Tabelle 6: MRP-14 positive Zellen in 30 Sichtfeldern / Präparat

Gruppe	Mittelwert	Standardabweichung	Min	Max	Anzahl
gesamt	73,9	41,4	23	208	32
Amyloidose	80,0	54,5	23	208	12
DN	70,2	32,3	34	129	20

Für CML ($p=0,109$), Imidazolon ($p=0,315$) und RAGE ($p=0,887$) konnte keine statistisch signifikante Beziehung zu MRP-14 ermittelt werden.

Zwischen NF κ B und der Anzahl der MRP-14 positiven Zellen wurde mit einer Signifikanz von $p=0,041$ ein Zusammenhang ermittelt. Die Abbildungen 8 und 9 zeigen MRP-14 positive Zellen in Nierenschnitten beider Patientengruppen.

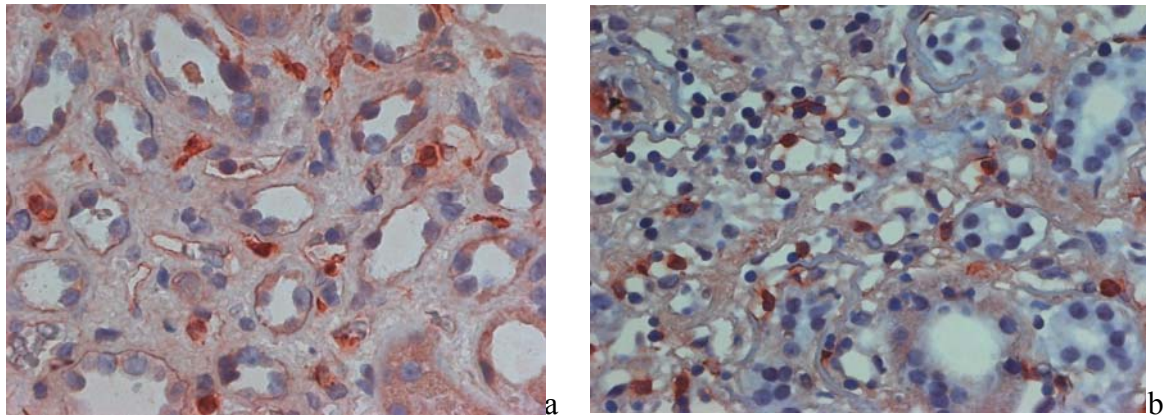


Abbildung 8: MRP-14 positive Zellen im Nierengewebe, 400fach vergrößert
 a) 67-jähriger Patient mit Amyloidose
 b) 49-jährige Patientin mit diabetischer Nephropathie

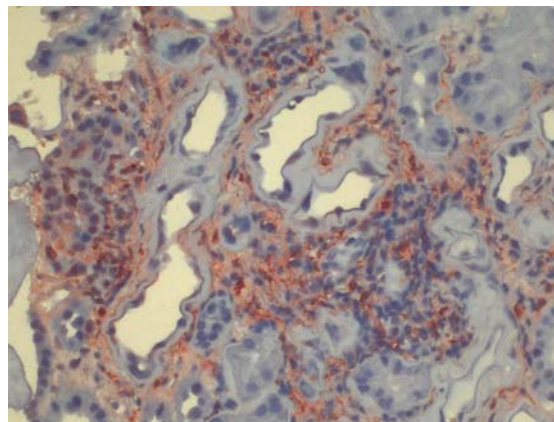


Abbildung 9: MRP-14 positive Zellen im Interstitium der Niere bei einer 49-jährigen Patientin mit diabetischer Nephropathie, 400fach vergrößert

6.2. Routineparameter in Serum- und Urinproben

Kreatinin

Für Kreatinin im Serum wurden die in Tabelle 7 ersichtlichen Werte gemessen. 92 % der untersuchten Personen lagen außerhalb des Normalbereiches.

Tabelle 7: Kreatinin im Serum ($\mu\text{mol/l}$) nach Krankheitsbildern

Gruppe	Mittelwert	Median	Standardabweichung	Min	Max	Anzahl	außerhalb Referenzbereich
gesamt	279,9	224,0	195,3	86	1026	25	92 %
Amyloidose	246,6	184,0	120,7	133	400	5	100 %
DN	288,2	226,0	211,5	86	1026	20	90 %

Tabelle 8 gibt einen Überblick über die Bestimmung von Kreatinin im Urin (in $\mu\text{mol/l}$). 72 % der Patienten lagen außerhalb des Referenzbereiches.

Tabelle 8: Kreatinin im Urin ($\mu\text{mol/l}$) nach Krankheitsbildern

Gruppe	Mittelwert	Median	Standardabweichung	Min	Max	Anzahl	außerhalb Referenzbereich
gesamt	6,0	6,0	2,5	2,1	10,8	25	72 %
Amyloidose	4,2	3,3	1,7	3,0	7,0	5	100 %
DN	6,5	6,3	2,5	2,1	10,8	20	65 %

Gesamtprotein und Albumin im Urin

Tabelle 9 zeigt die Gesamtproteinkonzentrationen im Urin (*mg/l*). Nur ein Patient mit einer diabetischen Nephropathie lag innerhalb, 96 % der Patienten außerhalb des Normbereiches (<150 *mg/l*).

Tabelle 9: Proteinurie (*mg/l*) nach Krankheitsbildern

Gruppe	Mittelwert	Median	Standardabweichung	Min	Max	Anzahl
gesamt	2612,8	1706,0	2574,5	111	9686	25
Amyloidose	1704,0	1706,0	233,5	1428	1991	5
DN	2840,0	1749,5	2844,1	111	9686	20

Für Albumin im Urin konnten die in Tabelle 10 veranschaulichten Werte gemessen werden (in *mg/l*):

Tabelle 10: Albuminurie (*mg/l*) nach Krankheitsbildern

Gruppe	Mittelwert	Median	Standardabweichung	Min	Max	Anzahl
gesamt	1806,0	1180,0	1961,7	67	7010	25
Amyloidose	1140,6	1180,0	302,1	783	1440	5
DN	1972,3	1170,0	2167,1	67	7010	20

Eine Mikroalbuminurie (30-300 *mg/l*) lag bei einem Patienten mit diabetischer Nephropathie vor. 96 % aller Patienten zeigten eine Makroalbuminurie als Ausdruck einer fortgeschrittenen Nierenschädigung.

Die Parameter Kreatinin in Serum und Urin, Proteinurie und Albuminurie waren nicht normal verteilt. Aus diesem Grund wurde zur statistischen Prüfung der *Mann-Whitney-U-Test*

angewendet. Die Kreatininkonzentration im Urin war signifikant niedriger ($p=0,049$) bei Patienten mit einer Amyloidose. Patienten mit diabetischer Nephropathie wiesen höhere Kreatininwerte im Serum sowie höhere Werte von Gesamtprotein und Albumin im Urin auf. Ein signifikanter Unterschied ließ sich statistisch nicht sichern.

6.3. AGE-Spiegel in Serum- und Urinproben

CML

Die CML-Werte im Serum (in *ng/ml*) sind in Tabelle 11 dargestellt.

Tabelle 11: CML im Serum nach Krankheitsbildern

Gruppe	Mittelwert	Median	Standardabweichung	Min	Max	Anzahl
gesamt	349,0	290,1	196,3	99,2	907,1	25
Amyloidose	348,3	219,5	331,9	99,2	907,1	5
DN	349,2	312,4	159,6	168,7	705,1	20
Kontrolle	415,6	413,0	104,8	237,0	627,0	45

In Bezug zur Kontrollgruppe lagen bei beiden Krankheitsbildern niedrigere Werte vor. Eine statistisch gesicherte Differenz ($p=0,046$) wurde mit dem *Kruskal-Wallis-Test* ermittelt. Die Maximalwerte für CML im Serum wurden durch Patienten mit Amyloidose und diabetischer Nephropathie erreicht. Ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen beiden Krankheitsbildern konnte nicht nachgewiesen werden ($p>0,05$).

Die Ergebnisse der Nε-Carboxymethyllysinbestimmung im Urin (in *ng/ml*) sind in Tabelle 12 und in Abbildung 10 dargestellt.

Tabelle 12: CML im Urin nach Krankheitsbildern

Gruppe	Mittelwert	Median	Standardabweichung	Min	Max	Anzahl
gesamt	432,2	358,3	273,2	140,3	1388,4	25
Amyloidose	368,3	299,8	219,0	205,1	750,0	5
DN	448,1	360,9	273,2	140,3	1388,4	20

Die erhöhten Werte der Patienten mit diabetischer Nephropathie waren statistisch nicht gesichert ($p > 0,05$).

Die statistische Überprüfung mittels *Wilcoxon-Test* zeigte im Serum und im Urin keine signifikanten Differenzen bezüglich des Nε-Carboxymethyllysins-Spiegels.

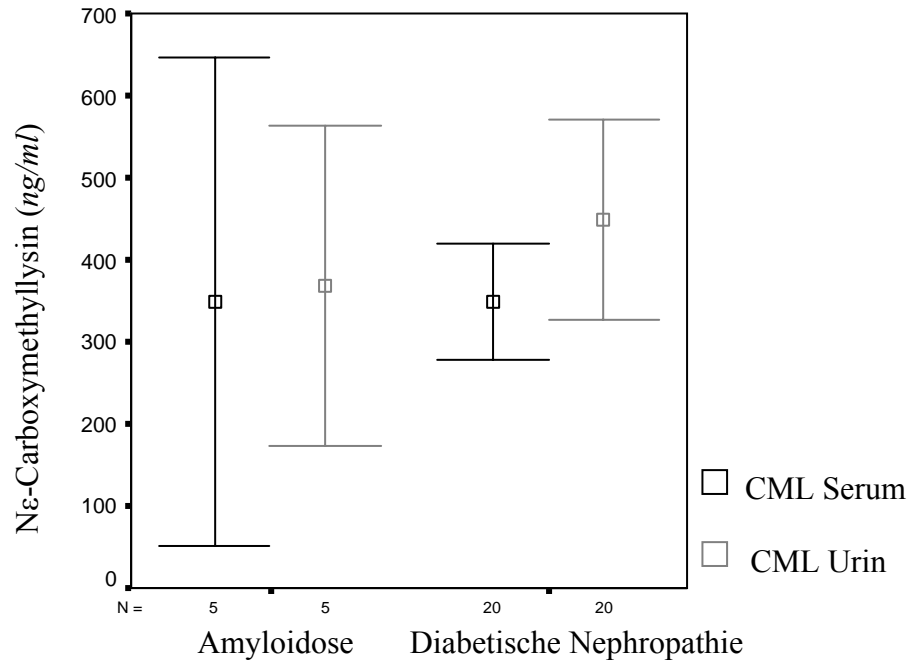


Abbildung 10: CML in Serum und Urin (Mittelwert +/- Standardabweichung)

Imidazolon

Tabelle 13 und 14 zeigen die für Imidazolon in Serum und Urin gemessenen Werte (in AU/l). Mittels *Mann-Whitney-U-Test* wurden keine statistisch relevanten Unterschiede zwischen Erkrankten und Kontrollpersonen sowie zwischen Amyloidose und diabetischer Nephropathie festgestellt.

Tabelle 13: Imidazolon im Serum nach Krankheitsbildern

Gruppe	Mittelwert	Median	Standardabweichung	Min	Max	Anzahl
gesamt	0,99	1,02	0,42	0,23	2,21	25
Amyloidose	0,78	0,66	0,24	0,53	1,10	5
DN	1,04	1,03	0,44	0,23	2,21	20
Kontrolle	0,92	0,89	0,29	0,37	1,58	48

Tabelle 14: Imidazolon im Urin nach Krankheitsbildern

Gruppe	Mittelwert	Median	Standardabweichung	Min	Max	Anzahl
gesamt	2,81	3,07	1,42	0,56	5,97	25
Amyloidose	1,91	1,10	1,88	0,56	5,21	5
DN	3,03	3,16	1,24	0,56	5,97	20

Die Imidazolonkonzentrationen waren im Urin höher als im Serum. Dieser Unterschied war im Gesamtkollektiv ($p < 0,001$) und in der Gruppe der Diabetiker ($p < 0,001$) statistisch signifikant.

Abbildung 11 verdeutlicht die Differenzen zwischen den Messwerten von Imidazolon in Serum und Urin für beide Patientengruppen.

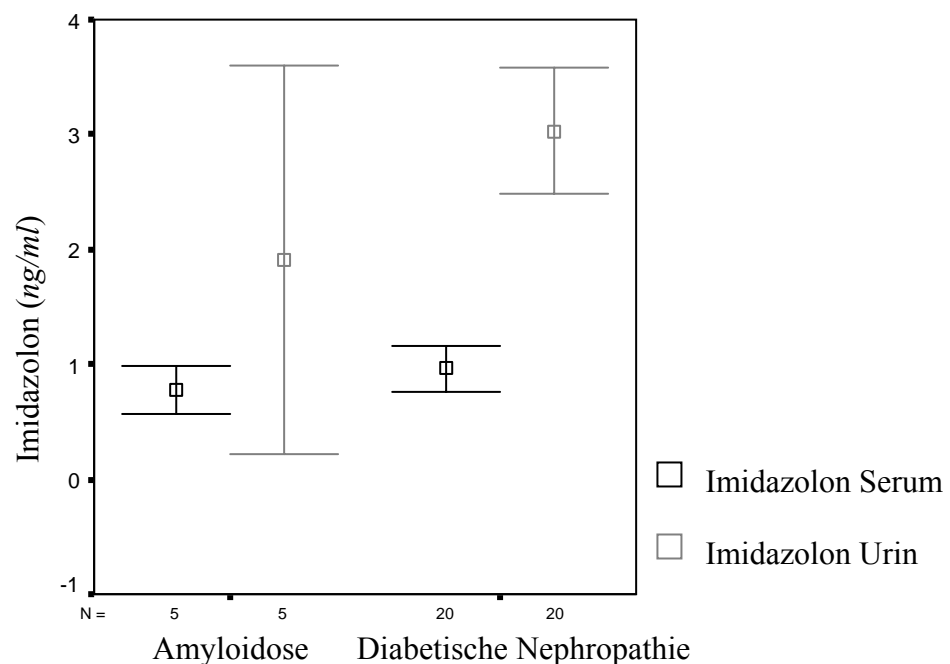


Abbildung 11: Imidazolon in Serum und Urin (Mittelwert +/- Standardabweichung)

6.4. Zusammenhänge zwischen AGE-Konzentration und Laborparametern

Bezüglich der Zusammenhänge von gemessenen AGE-Konzentrationen untereinander sowie den Beziehungen zwischen Routinelaborparametern und AGE-Konzentrationen wurden 20 Patienten mit diabetischer Nephropathie und 5 Patienten mit einer Amyloidose ausgewertet. Eine zusammenfassende Darstellung aller berechneten Korrelationen gibt Tabelle 19 wieder.

Korrelationen für alle Patienten

In der Gesamtgruppe aller untersuchten Patienten mit Amyloidose und diabetischer Nephropathie ergaben sich signifikante Korrelationen zwischen CML im Serum und Kreatinin im Serum ($r=0,555$; $p=0,004$) sowie CML im Serum und Kreatinin im Urin

($r=0,425$; $p=0,034$). Des Weiteren wurden Zusammenhänge zwischen CML im Urin und Kreatinin im Urin ($r=0,524$; $p=0,007$), CML im Urin und Proteinurie ($r=0,545$; $p=0,005$) sowie CML im Urin und Albuminurie ($r=0,482$; $p=0,015$) festgestellt. Eine signifikante Beziehung wurde auch zwischen CML im Urin und Imidazolon im Urin ($r=0,715$ und $p<0,001$) bestimmt (Abbildung 12).

Imidazolon im Serum zeigte statistisch gesicherte Zusammenhänge mit dem Kreatininwert im Serum ($r=0,653$; $p<0,001$) sowie der Imidazolonausscheidung im Urin ($r=0,429$; $p=0,032$). Nach *Spearman* konnte auch für Imidazolon und Kreatinin im Urin ($r=0,637$; $p=0,001$), Imidazolon im Urin und Proteinurie ($r=0,467$; $p=0,019$) sowie Imidazolon im Urin und Albuminurie ($r=0,429$; $p=0,032$) ein statistisch signifikanter Zusammenhang nachgewiesen werden.

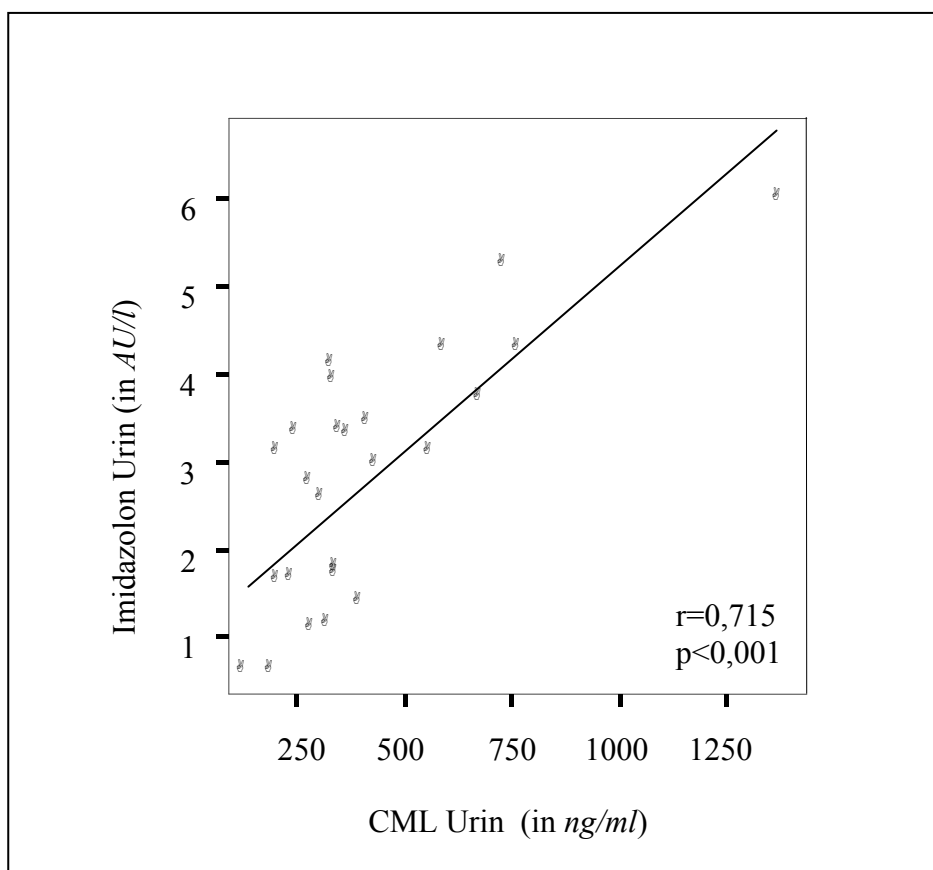


Abbildung 12: Korrelation CML und Imidazolon im Urin bei allen Patienten

Korrelationen der Patienten mit diabetischer Nephropathie

Patienten mit einer diabetischen Nephropathie zeigten statistisch signifikante Beziehungen zwischen CML im Urin und Proteinurie ($r=0,598$; $p=0,004$) sowie Albuminurie ($r=0,610$; $p=0,004$). Auch Imidazolon im Urin korrelierte mit den beiden genannten Laborparametern (Imidazolon im Urin – Proteinurie $r=0,525$; $p=0,018$; Imidazolon im Urin - Albuminurie $r=0,568$; $p=0,009$). Ein gesicherter Zusammenhang bestand ebenfalls zwischen Imidazolon und Kreatinin im Serum ($r=0,605$; $p=0,005$) sowie zwischen CML und Imidazolon im Urin ($r=0,589$; $p=0,006$; siehe Abbildung 6). Eine statistisch signifikante Beziehung zwischen CML im Serum und den Routinelaborparametern bestand nicht.

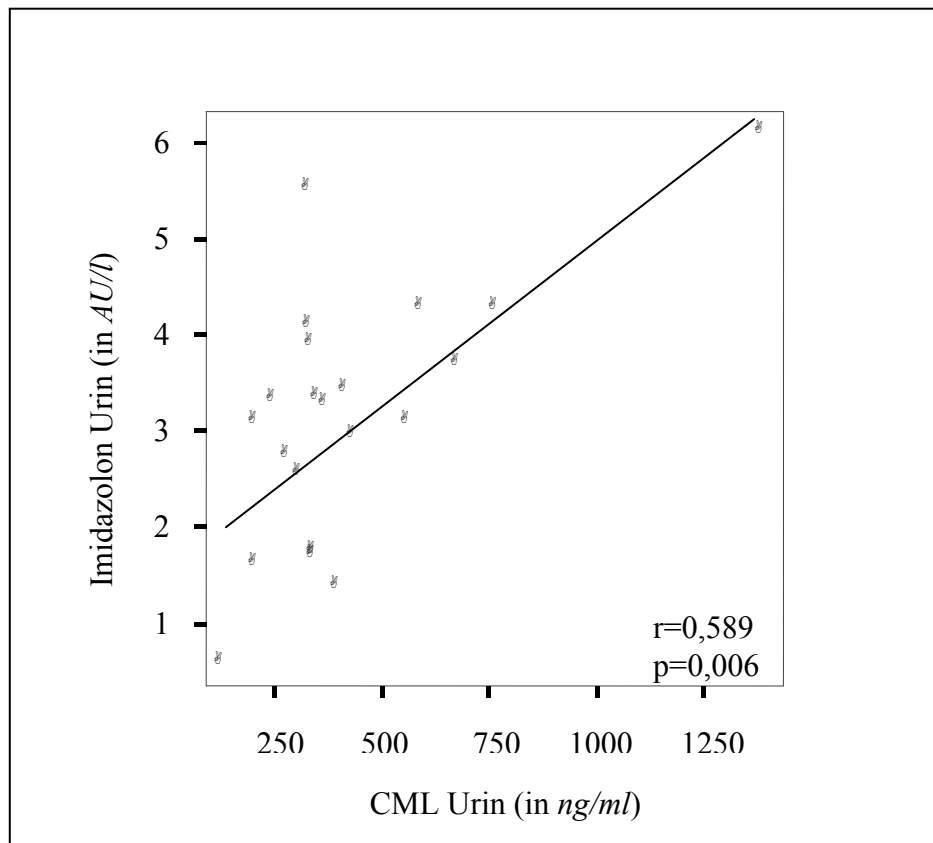


Abbildung 13: Korrelation von CML und Imidazolon im Urin bei Patienten mit diabetischer Nephropathie

Korrelationen der Patienten mit Amyloidose

Bei den Patienten mit Amyloidose bedingter Nierenschädigung (n=5) lag ein statistisch gesicherter Zusammenhang zwischen Kreatinin und CML im Serum ($r=0,900$; $p=0,037$), Kreatinin und Imidazolon im Serum ($r=1,000$; $p=0$) sowie Kreatinin im Serum und Imidazolon im Urin ($r=0,900$; $p=0,037$) vor. Innerhalb der AGE-Gruppen wurden Beziehungen für CML und Imidazolon im Serum ($r=0,900$; $p=0,037$), CML im Serum und Imidazolon im Urin ($r=1,000$; $p=0$) sowie Imidazolon im Serum und Imidazolon im Urin ($r=0,900$; $p=0,037$) gemessen. Abbildung 14 stellt den Zusammenhang zwischen CML und Imidazolon im Serum dar.

Weder die Kreatininwerte noch die Spiegel der glykierten Endprodukte korrelierten mit Protein oder Albumin im Urin. CML im Urin zeigte keine statistisch signifikante Korrelation mit einem der Laborparameter oder AGE-Spiegel.

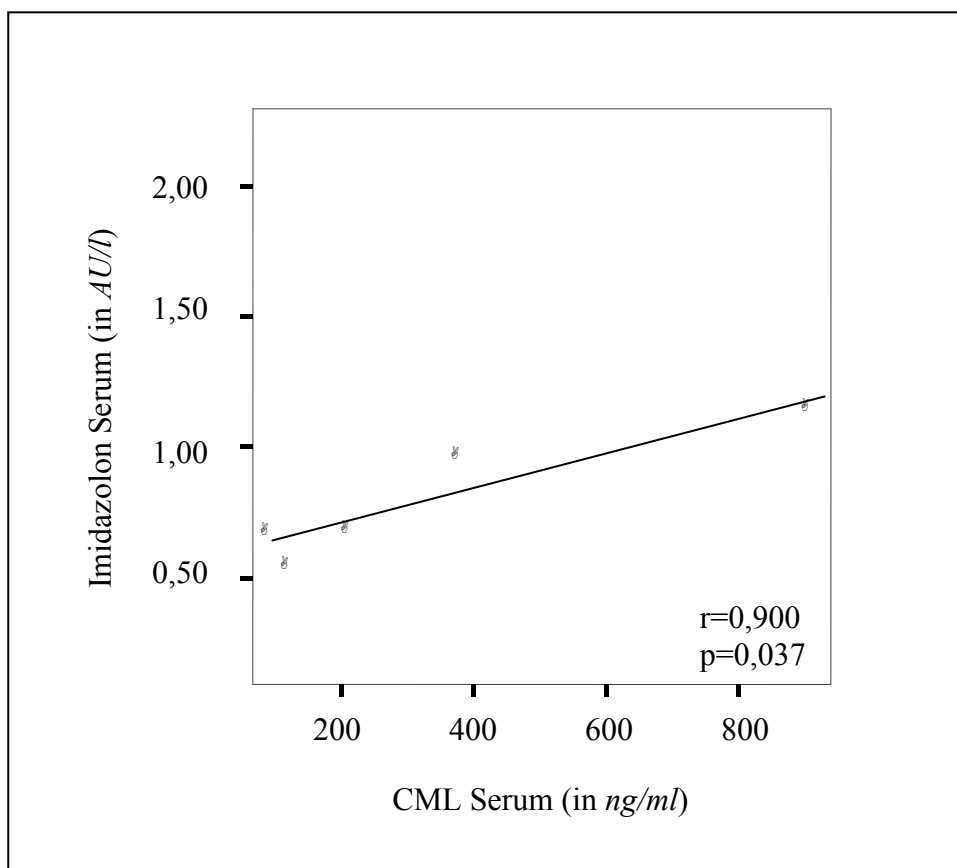


Abbildung 14: Korrelation von CML und Imidazolon im Serum bei Patienten mit einer Amyloidose

6.5. Zusammenhang zwischen AGE-Konzentration und Alter

Beim Gesamtpatientenkollektiv sowie in der Gruppe mit Diabetes mellitus konnten keine Zusammenhänge zwischen AGE-Konzentration und dem Alter der Patienten erkannt werden. Für Patienten mit einer Amyloidose war eine Korrelation zwischen Alter und CML-Konzentration im Urin statistisch signifikant ($r=0,900$; $p=0,037$).

6.6. Vergleich Amyloidose der Niere und diabetische Nephropathie

Immunhistochemie

Mittels immunhistochemischer Methoden gelang der Nachweis von CML, Imidazolon, RAGE, NF κ B sowie MRP-14 in den Nierenstrukturen für beide Krankheiten. Die Tabellen 15 und 16 geben einen Überblick über den Anteil der positiv gefärbten Nierenstrukturen. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen diabetischer Nephropathie und Amyloidose konnten mit dem *Chi-Quadrat Test* nicht nachgewiesen werden. Die Anzahl der MRP-14 positiv gefärbten Zellen zeigten ebenfalls keine statistisch relevanten Differenzen.

Tabelle 15: Anteil der positiv gefärbten Präparate nach Antikörper und Nierenstruktur, Patienten mit Diabetes mellitus, n=20 (in %)

	CML	IMI	NfκB	RAGE
Tubulusepithel	100	100	100	100
Endothelzellen	100	100	100	50,0
Interstitium	68,8	88,2	66,7	94,1
Mesangiumzellen	87,5	62,5	29,4	35,3

Tabelle 16: Anteil der positiv gefärbten Präparate nach Antikörper und Nierenstruktur, Patienten mit Amyloidose, n=12 (in %)

	CML	IMI	NFκB	RAGE
Tubulusepithel	100	100	100	100
Endothelzellen	100	100	100	33,3
Interstitium	41,7	85,7	88,9	66,7
Mesangiumzellen	75,0	50,0	58,3	16,7

Die 12 Patienten mit einer Amyloidose setzen sich aus 5 Patienten mit der Amyloidose AA und aus 7 Personen mit Amyloidose AL zusammen. Für beide Patientengruppen wurde eine Anfärbung von Tubulusepithelzellen, Endothelzellen, Entzündungsinfiltraten im Interstitium und Mesangiumzellen beobachtet. Unterschiede zwischen beiden Gruppen wurden nicht festgestellt.

Laborparameter in Serum und Urin

Beide Erkrankungsbilder zeigten pathologische Werte für Kreatinin in Serum und Urin sowie für Albumin und Gesamtprotein im Urin. Für die Kreatininkonzentration im Urin konnte ein signifikanter Unterschied ($p=0,049$) mit höheren Werten bei diabetischer Nephropathie nachgewiesen werden.

Beide Erkrankungsbilder zeigten Korrelationen zwischen AGE-Spiegel und Kreatinin im Serum. CML und Imidazoln im Urin korrelierten bei diabetischer Nephropathie mit der Albuminurie und Proteinurie, nicht jedoch bei Patienten mit einer Amyloidose. Bezüglich des Patientenalters wurde bei Amyloidose eine Korrelation zur CML-Konzentration im Urin festgestellt ($r=0,900$; $p=0,037$). Einen zusammenfassenden Überblick über die bestimmten Korrelationen gibt Tabelle 19.

6.6. Immunhistochemische Untersuchungen in Abhängigkeit von der Nierenfunktionseinschränkung

Bei 14 Patienten erfolgten immunhistochemische Untersuchungen und eine Kreatininbestimmung im Serum, darunter 13 Patienten mit Diabetes mellitus und ein Patient mit Amyloidose AL.

Bei 4 Patienten lag der Serumkreatininwert $< 200 \mu\text{mol/l}$, bei 10 Patienten $> 200 \mu\text{mol/l}$.

Die Patienten mit einem Serumkreatininwert $< 200 \mu\text{mol/l}$ werden in Tabelle 17, die Patienten mit einem Wert $> 200 \mu\text{mol/l}$ in Tabelle 18 dargestellt.

Tabelle 17: Anteil der positiv gefärbten Präparate nach Antikörper und Nierenstruktur bei einem Serumkreatininwert $< 200 \mu\text{mol/l}$, (n=4) in %

	CML	IMI	NFκB	RAGE
Tubulusepithel	100	100	100	100
Endothelzellen	100	100	100	25
Interstitium	50,0	66,7	50,0	100
Mesangiumzellen	100	50,0	25,0	25,0

Tabelle 18: Anteil der positiv gefärbten Präparate nach Antikörper und Nierenstruktur bei einem Serumkreatininwert $> 200 \mu\text{mol/l}$, (n=10) in %

	CML	IMI	NFκB	RAGE
Tubulusepithel	100	100	100	100
Endothelzellen	100	100	100	37,5
Interstitium	87,5	88,9	88,9	87,5
Mesangiumzellen	75,0	87,5	50,0	50,0

Die Patienten mit höheren Serumkreatininwerten zeigten für alle Antikörper einen höherer prozentualen Anteil an positiv gefärbten Präparaten.

Tabelle 17: Korrelationskoeffizienten

Gruppe	Korrelation		Korrelations- koeffizient r	Signifikanz p
Gesamt	Serum CML	Serum Kreatinin	0,555	0,004
	Serum CML	Urin Kreatinin	0,425	0,034
	Urin CML	Urin Kreatinin	0,524	0,007
	Urin CML	Urin Imidazolon	0,715	< 0,001
	Urin CML	Urin Protein	0,545	0,005
	Urin CML	Urin Albumin	0,482	0,15
	Serum Imidazolon	Serum Kreatinin	0,653	<0,001
	Serum Imidazolon	Urin Imidazolon	0,429	0,032
	Urin Imidazolon	Urin Kreatinin	0,637	0,001
	Urin Imidazolon	Urin Protein	0,467	0,019
	Urin Imidazolon	Urin Albumin	0,429	0,032
Diabetische Nephropathie	Urin CML	Urin Imidazolon	0,589	0,006
	Urin CML	Urin Protein	0,598	0,005
	Urin CML	Urin Albumin	0,610	0,004
	Serum Imidazolon	Serum Kreatinin	0,605	0,005
	Urin Imidazolon	Urin Protein	0,525	0,018
	Urin Imidazolon	Urin Albumin	0,568	0,009
Amyloidose	Serum CML	Serum Kreatinin	0,900	0,037
	Serum CML	Serum Imidazolon	0,900	0,037
	Serum CML	Urin Imidazolon	1,000	0
	Serum Imidazolon	Serum Kreatinin	1,000	0
	Serum Imidazolon	Urin Imidazolon	0,900	0,037
	Urin Imidazolon	Serum Kreatinin	0,900	0,037
	Urin CML	Alter	0,900	0,037

7 Diskussion

Advanced Glycation Endproducts fördern physiologische und pathologische Veränderungen im menschlichen Körper, insbesondere in Beziehung zu langlebigen Proteinen. Daraus resultiert ihre Bedeutung für die Entstehung und das Voranschreiten verschiedener chronischer Erkrankungen.

Durch Modifikation des β_2 -Mikroglobulins wird in die Pathogenese der dialyseassoziierten Amyloidose eingegriffen. Die Aktivierung von RAGE bewirkt eine Stimulation der Chemotaxis und Sekretion von Zytokinen, z.B. Interleukin-1 β , IL-6 und TNF- α (*Iida et al. 1994, Miyata et al. 1996a, Raj et al. 2000*). Durch Steigerung des oxidativen und Carbonylstresses werden neben der Niere auch Knochen und Bindegewebe geschädigt (*Miyata et al. 2000*). Komplikationen wie Karpaltunnelsyndrom, Arthropathien und systemische Organschäden sind die Folge (*Drueke 1999, Niwa 2001*).

Die Bildung der glykierten Endprodukte, besonders in Geweben mit niedriger Turnover-Rate, wird durch Alterungsprozesse und chronische Erkrankungen verstärkt. Veränderungen im Kristallingewebe der Augenlinse führen durch Proteinaggregation, Oxidation, Crosslink-Bildung sowie verstärkter Pigmentierung und Fluoreszenz zu Katarakt (*Araki et al. 1992, Saxena et al. 2000, Franke et al. 2003a, Franke et al. 2003c*). Die diabetische Stoffwechsellage kann als Hauptursache für das frühzeitige Auftreten einer Katarakt angesehen werden (*Struck et al. 2001, Pokupec et al. 2003*).

Durch den hohen Gehalt an Kollagen, Laminin, Fibronectin und Elastin stellt auch die Haut ein Zielgewebe für AGE-Akkumulationen dar. Toxische Effekte werden für die Produktion von freien Radikalen, Senkung der Stickstoffmonoxid-Aktivität und die damit verbundene Minderung der endothelabhängigen Relaxation verantwortlich gemacht (*Jeanmaire et al. 2001*). Der AGE-Gehalt der Dermis korreliert mit dem Alter und der UV-Strahlenexposition und kann zu einer Hyperplasie sowie Elastizitätsabnahme der Haut führen. Das entsprechende Krankheitsbild wird als Aktinische Elastose bezeichnet (*Mizutari et al. 1997*).

Weiterhin können im Rahmen neurodegenerativer Erkrankungen (z.B. Morbus Alzheimer, Morbus Pick, Morbus Parkinson, Amyotrophe Lateralsklerose) Ablagerungen glykierter Endprodukte nachgewiesen werden (*Kimura et al. 1996, Sasaki et al. 1998, Shibata et al. 2000, Bar et al. 2003*). Beim Morbus Alzheimer findet sich eine Akkumulation in senilen

Plaques, veränderten Fibrillen sowie in Neuronen, Astrocyten und Mikroglia (*Takeda et al. 1998*). Neben dem β -Amyloid-Protein werden auch Apolipoprotein E und τ -Protein modifiziert (*Sasaki et al. 1998*). Die Aktivierung intrazellulärer Signalmechanismen führt zur vermehrten Freisetzung von Zytokinen und freien Radikalen (*Münch et al. 1998*). Der damit verbundene Untergang von Nervenzellen erklärt die pathogenetische Bedeutung der AGEs im Rahmen dieser neurologischen Erkrankungen (*Yan et al. 1994b*).

Auch chronische Entzündungen wie die Rheumatoide Arthritis werden durch freie Sauerstoffradikale verstärkt (*Takahashi et al. 1997*). Die in Synovialflüssigkeit, Urin und Plasma nachweisbar erhöhte AGE-Konzentration korreliert mit dem Grad der inflammatorischen Reaktion und könnte in Zukunft zur Verlaufskontrolle der chronischen Polyarthritiden herangezogen werden (*Miyata et al. 1998b, Chen et al. 1999, Drinda et al. 2002, Drinda et al. 2005, Hein et al. 2005*).

Advanced Glycation Endproducts sind außerdem bei der Entwicklung der idiopathischen Lungenfibrose, Osteoporose und Arteriosklerose beteiligt (*Miyata et al. 1996b, Matsuse 1998, Kasper und Funk 2001, Hein et al. 2003*). Die AGE-Ablagerungen lassen sich bei letzterer innerhalb der Makrophagen, Schaumzellen und glatten Muskelzellen nachweisen (*Kume et al. 1995*). Durch Akkumulation in Gefäßwänden wird die Intima zur Produktion extrazellulärer Matrix stimuliert, welche zur Zunahme der Gefäßdicke und Abnahme des Gefäßlumens führt (*Singh et al. 2001*). Makrophagen sind durch eine vermehrte Produktion von Zytokinen und Wachstumsfaktoren wesentlich an diesem Prozess beteiligt (*Kalousová et al. 2003*). Die glykierten Endprodukte zerstören Endothelzellen, vermindern die Stickstoffmonoxid-Aktivität und führen zur Zunahme der prokoagulatorischen Aktivität mit resultierender Atherombildung. AGE-modifizierte LDLs erhöhen den Lipoproteingehalt der Gefäßwände und erklären in Kombination mit den anderen genannten Faktoren das Fortschreiten der Arteriosklerose (*Niwa et al. 1997b, Kalousová et al. 2003, Jakuš und Rietbock 2004*).

Zusammenfassend ist die verstärkte Bildung der AGE-Strukturen durch Einwirkung von oxidativem Stress zu erklären, wobei die Advanced Glycation Endproducts wiederum selbst oxidativen Stress im Organismus induzieren (*Nawroth et al. 1999, Kasper und Funk 2001*). Die Progression chronischer Erkrankungen, wie sie auch bei Diabetes mellitus beobachtet wird, ist Folge dieser Vorgänge (*Schiel et al. 2004*). Ein Zusammenhang zwischen erhöhten AGE-Konzentrationen und Erkrankungsschwere bzw. erhöhten Werten für glykiertes

Hämoglobin (HbA_{1c}) wurde bereits vielfach beschrieben (*Brownlee et al. 1984, Krapfenbauer et al. 1998, Bierhaus et al. 1998, Singh et al. 2001*). Weiterhin wurde in fortgeschrittenem Erkrankungsstadium der diabetischen Nephropathie eine vermehrte Akkumulation von AGEs im Nierengewebe festgestellt. So erfolgte ein positiver CML- bzw. Imidazolon-Nachweis im Mesangium, in Kapillarwänden und nodulären Läsionen, welcher bei Gesunden bzw. Diabetikern ohne diabetische Nephropathie nicht nachgewiesen werden konnte (*Horie et al. 1997, Niwa et al. 1997a, Suzuki et al. 1999, Tanji et al. 2000*).

Die Akkumulation der AGEs im Nierengewebe führt zu einer Veränderung der Struktur und Funktion von Gewebeproteinen sowie einer Stimulation von verschiedenen Zellantworten, z.B. die Induktion von freien Radikalen (*Horie et al. 1997*). Im Nierengewebe lassen sich eine Hypertrophie der Glomeruli, eine Mesangialvermehrung, Lipidablagerungen und damit verbunden eine Hyperfiltration und Aktivierung der Gerinnungskaskade nachweisen (*Raj et al. 2000, Singh et al. 2001*). Ablagerungen in den Gefäßwänden führen zu einer Dysfunktion des Endothels mit Vasokonstriktion sowie Basalmembranverdickung mit Elastizitätsverlust der Gefäße und fördern damit die Progression der Mikro- und Makroangiopathie (*Singh et al. 2001, Vlassara und Palace 2003*). Die Akkumulation der AGEs bedingt demnach eine Progression der Nierenerkrankung, die sich in einer Erhöhung von Serumkreatinin und Albuminurie mit Anämieentwicklung und Verschlechterung der arteriellen Hypertonie nachweisen lässt (*Raj et al. 2000, Singh et al. 2001, Hasslacher 2002*). Neben diätetischen Maßnahmen, antihypertensiver Therapie und einer optimalen Blutzuckereinstellung stellen die Hemmung der AGE-Akkumulation und die Zerstörung bereits gebildeter AGEs weitere Ansätze bei der Therapie der diabetischen Nephropathie dar (*Nawroth et al. 1999, Raj et al. 2000, Plum und Hader 2002, Kalousová et al. 2004*).

In dieser Arbeit wurden Nierenbiopsien von 20 Patienten mit einer diabetischen Nephropathie mittels Immunhistochemie untersucht. Innerhalb des Interstitiums gelang der positive Nachweis von CML in 68,8 %, Imidazolon in 88,2 % und von NFκB in 66,7 % der Fälle. Der Rezeptor der AGEs (RAGE) konnte sogar in 94,1 % der Infiltrate nachgewiesen werden. Im Interstitium konnte eine vermehrte Ansammlung von Entzündungsinfiltrationen beobachtet werden. Dies ist ein Hinweis auf den kausalen Zusammenhang zwischen vermehrter AGE-Akkumulation und chronischer Entzündung, welcher durch die Interaktion zwischen AGE und RAGE sowie der damit verbundenen Aktivierung von Makrophagen und anschließender

Sekretion von inflammatorischen Zytokinen hervorgerufen wird (*Singh et al. 2001, Kalousová et al. 2004*).

Die 12 Nierenbiopsien von Patienten mit einer Amyloidose, welche ebenfalls immunhistochemisch untersucht wurden, zeigten bezüglich der Anfärbung des Interstitiums für CML in 41,7 %, Imidazolon 85,7 %, NFκB 88,9 % und RAGE 66,7 % ein positives Ergebnis. *Hoshi et al. gelang 1996* der Nachweis der AGEs innerhalb der Ablagerungen von Amyloids AA nicht. In den Folgejahren wurde mehrfach eine Akkumulation von CML im Nierengewebe bei Amyloidose beschrieben (*Horie et al. 1997, Uesugi et al. 2001, Röcken et al. 2003*). Ein Nachweis von Imidazolon wurde für AA-Amyloidose und AL-Amyloidose bisher nicht berichtet.

Bei den eigenen Untersuchungen fiel in beiden Patientengruppen der höhere Anteil an Imidazolon- gegenüber CML-positiven Präparaten auf. Daraus könnte sich eine stärkere Beteiligung von Imidazolon gegenüber CML bei Entzündungsprozessen ableiten lassen. RAGE war im Interstitium ebenfalls immunhistochemisch nachweisbar. Eine Imidazolon-RAGE-Interaktion wäre möglich, ist jedoch bisher nicht bekannt. Die Ko-Lokalisation von CML und RAGE ist ein Hinweis auf die Beteiligung der AGE-RAGE-Interaktion an den Nierenveränderungen bei Amyloidose. Der Nachweis einer CML-RAGE-Interaktion wurde von mehreren Autoren beschrieben (*Kislinger et al. 1999, Tanji et al. 2000*). CML-Addukte werden als die relevanten Liganden für die Bindung mit RAGE angesehen, abgeleitet aus einem Vergleich mit Pentosidin (*Tanji et al. 2000*).

Während die Anfärbung im Interstitium für Imidazolon bei beiden Erkrankungen nahezu gleich war, konnten CML und RAGE bei diabetischer Nephropathie stärker nachgewiesen werden.

Durch Bindung von AGEs an RAGE kommt es innerhalb der Makrophagen zur Freisetzung freier Radikale und einer Induktion von oxidativem Stress. Über eine Signalkaskade von p21^{ras} und MAP-Kinase wird der Transkriptionsfaktor NFκB aktiviert (*Yan et al. 1994a, Hofmann et al. 1999b, Singh et al. 2001, Yeh et al. 2001*). Die Blockade von p21^{ras} bewirkt eine verminderte Expression von NFκB (*Lander et al. 1997*). Durch Aktivierung des Transkriptionsfaktors wird neben einer Vasokonstriktion die Freisetzung von Thrombomodulin und proinflammatorischen Zytokinen hervorgerufen.

Für die in dieser Arbeit untersuchten Patienten wurde NFκB innerhalb der interstitiellen Entzündungsinfiltrate in 66,7 % der Diabetesfälle und in 88,9 % der Amyloidosepräparate

nachgewiesen. Die immunhistochemischen Untersuchungen lieferten Hinweise auf eine Kausalkette mit AGE-RAGE Interaktion und Aktivierung von NFκB. Die Bedeutung des Transkriptionsfaktors im Rahmen inflammatorischer Reaktionen wird durch die Korrelation mit MRP-14 positiven Zellen unterstrichen ($p=0,041$). Myeloid-related Protein 14, welches im menschlichen Körper einen Komplex mit MRP-8 bildet, wird von Entzündungszellen exprimiert und erfüllt antifungale, antibakterielle und chemotaktische Aufgaben (*Hessian et al. 1993, Rammes et al. 1997*). Die Anzahl der MRP-14 positiven Monocyten bzw. Makrophagen in 30 Sichtfeldern / Präparat betrug im Mittel für diabetische Nephropathie 70,2 und für Amyloidose 80,0. Patienten mit einer Amyloidose zeigten damit für MRP-14 und NFκB eine stärkere Anfärbung. Eine Verkettung von Entzündungsinfiltration, NFκB und MRP-14 ist mit Hilfe dieser Befunde zu vermuten.

Interessant ist das unterschiedliche Verhalten von Patienten mit Amyloidose AA gegenüber Amyloidose AL. Amyloidose AA entsteht durch Umformung des Akute-Phasen-Proteins Serumamyloid A, wodurch eine engere Beziehung zur Entzündung als bei Amyloidose AL, deren Vorläuferprotein Immunglobulinketten sind, besteht. Ein verändertes Verhalten von CML und RAGE bei der Amyloidose AL gegenüber AA wurde in anderen Studien festgestellt (*Uesugi et al. 2000, Röcken et al. 2003*). *Uesugi et al. (2000)* fand bei Amyloidose AL in Fällen mit langjähriger Nephropathie eine CML-Akkumulation. Begründet wird dies mit einer verminderten Oxidation und kürzeren Erkrankungszeit der AL-Patienten. Der immunhistochemische Nachweis von Imidazolon bei Patienten mit einer Amyloidose AA und AL wurde bisher nicht untersucht. Lediglich bei der dialyseassoziierten Amyloidose, deren Vorläuferprotein das β_2 -Mikroglobulin ist, gelang eine positive Reaktion für Imidazolon (*Niwa et al. 1997a, Brancaccio et al. 2000*). Innerhalb der Amyloidablagerungen lässt sich eine heterogene Gruppe von AGEs feststellen, deren Bild unter anderem durch die Akkumulation von CML bedingt ist (*Röcken et al. 2003*).

Die hier untersuchten Amyloidosefälle lieferten deutliche Anhaltspunkte, dass Imidazolon dieser heterogenen Gruppe ebenfalls angehört. Allerdings wurden nur 5 Patienten mit Amyloidose AA und 7 mit Amyloidose AL untersucht. CML und Imidazolon sowie RAGE, MRP-14 und NFκB waren in beiden Patientengruppen nachweisbar. Zwischen den beiden Formen wurde aber kein signifikanter Unterschied eruiert. Aufgrund der geringen Fallzahlen war eine exakte Differenzierung nicht möglich. Somit wurden die Patienten mit Amyloidose

als eine einheitliche Gruppe betrachtet. Die Ergebnisse bezüglich der verschiedenen Amyloidosegruppen rechtfertigen weitere Studien auf diesem bisher noch unzureichend untersuchten Gebiet um weitere Informationen über Organfunktion, Progression und mögliche Therapienansätze zu erhalten.

In den Mesangiumzellen wurde bei Patienten mit diabetischer Nephropathie CML in 87,5 %, Imidazolon in 62,5 %, RAGE in 35,3 % und NFκB in 29,4 % der Fälle nachgewiesen. CML zeigte sich innerhalb dieser Zellen dominant gegenüber den anderen Parametern. Diese Beobachtung wurde bei Amyloidose ebenfalls festgestellt, CML war in 75,0 %, Imidazolon in 50,0 %, RAGE in 16,7 % und NFκB in 58,3 % der Fälle positiv. Patienten mit einer diabetischen Nephropathie zeigten für CML, Imidazolon und RAGE eine stärkere Anfärbung, während NFκB bei Patienten mit Amyloidose einen höheren Anteil positiver Reaktionen aufwies.

Aufgrund der ausgeprägten diabetischen Glomerulosklerose war mit einer hohen Immunreaktivität der AGEs im Mesangium zu rechnen (*Tanji et al. 2000*). NFκB und RAGE zeigten eine verminderte positive Reaktion, wodurch die Vermutung entsteht, dass Mesangiumzellen trotz phagozytierender Funktion weniger an der Entzündungsreaktion beteiligt sind. Bei *Tanji et al. (2000)* gelang der Nachweis von RAGE innerhalb der Mesangiumzellen nicht. Ursachen für diese abweichende Beobachtung könnten in Antikörperdifferenzen oder in einer unterschiedlichen Vorbehandlung während der immunhistochemischen Färbung liegen. Die Akkumulation der AGEs führt zu einer mesangialen Expansion und damit zu einer Progression der Glomerulosklerose (*Vlassara et al. 1994*). Unter Umständen stellt die Ablagerung von CML, dessen Entstehung eng an oxidativen Stress gekoppelt ist, die Hauptursache für die Schäden innerhalb des Glomerulus dar (*Busch et al. 2004*).

Ein aufschlussreicher Gesichtspunkt konnte für die Amyloidose und die diabetische Nephropathie im Bereich der Tubuli beobachtet werden. Tubulusepithelzellen haben eine hohe Affinität für Advanced Glycation Endproducts. In früheren Studien wurde eine positive Reaktion im Tubulusbereich gesunder Personen beobachtet, wahrscheinlich durch eine Reabsorption von Imidazolon und CML (*Horie et al. 1997, Niwa et al. 1997b, Uesugi et al. 2000*). Im Bereich der tubulären Basalmembranen zeigten die in dieser Arbeit untersuchten

Fälle dagegen eine Aussparung für alle verwendeten Antikörper. Somit wurde eine differente Beobachtung gegenüber früheren Studien gemacht (*Nishino et al. 1995, Tanji et al. 2000*). Eine denkbare Begründung wäre die komplexe Vernetzung der AGE-Ablagerungen, welche eine Anfärbung der Strukturen verhindert. Die Basalmembranen im Glomerulus zeigten bei den immunhistochemischen Untersuchungen eine positive Reaktion gegenüber CML, Imidazolon, RAGE und NFκB. Diese Beobachtungen wurden für CML bereits von *Tanji et al. 2000* beschrieben.

Eine hohe Affinität zu den verwendeten Antikörpern wurde für beide Erkrankungen im Bereich des Endothels nachgewiesen. CML, Imidazolon und NFκB waren in allen 37 untersuchten Fällen positiv. Lediglich der Rezeptor der AGEs zeigte eine geringere Nachweisquote (diabetische Nephropathie 50,0 %, Amyloidose 33,3 %). Dieser Gesichtspunkt spricht für eine verminderte Expression von RAGE im Gefäßendothel (*Tanji 2000*). Für beide Krankheitsbilder konnten unter Verwendung der 4 Antikörper positive Reaktionen innerhalb der glatten Muskelzellen der Gefäßwände beobachtet werden.

Die Betrachtung der einzelnen Antikörper nach Geschlecht und Alter erbrachte wenig relevante Befunde. Beide Krankheitsbilder zeigten für Männer und Frauen ein gleichartiges Verhalten gegenüber CML, Imidazolon, RAGE, NFκB und MRP-14. Entstehung und Pathogenese der AGE-Akkumulation unterliegen somit keinen geschlechtsabhängigen, z.B. hormonellen oder anderen Vorgängen. Vielfach wurde stattdessen die Relevanz des Alters für die Bildung der glykierten Endprodukte beschrieben (*Ando et al. 1999, Kasper und Funk 2001, Ulrich und Cerami 2001, Vlassara und Palace 2003*). Für einige Patienten konnte dieses Verhalten bestätigt werden. Patienten mit Amyloidose zeigten eine positive Korrelation zwischen dem Anteil der MRP-14 gefärbten Zellen und dem Lebensalter ($r=0,705$; $p=0,010$) und lieferten somit Hinweise auf eine höhere Entzündungsaktivität im Nierengewebe älterer Patienten. In der Gruppe der Diabetiker konnte diese Beziehung nicht festgestellt werden. Eine positive Korrelation zu den anderen verwendeten Antikörpern bestand ebenfalls nicht. Gründe für den in dieser Untersuchung geringen Zusammenhang könnten im noch relativ jungen Lebensalter der Gesamtgruppe gesehen werden. Das mittlere Alter der untersuchten Diabetiker betrug 59,0. Die 12 untersuchten Patienten mit Amyloidose waren zum Zeitpunkt der Biopsie im Durchschnitt 62,8 Jahre alt. Weiterhin besteht die Vermutung, dass

krankheitsspezifische Veränderungen von Diabetes mellitus und Amyloidose einen bedeutenderen Anteil an der Entstehung der AGEs haben als die Einflüsse des Alters.

Die Immunhistochemie stellt eine aussagekräftige Methode zum Nachweis der AGEs dar, allerdings bestehen Nachteile bezüglich schneller und einfacher Durchführung, Quantifizierung und Reproduzierbarkeit. Eine Erhöhung der Aussagekraft wurde in dieser Arbeit durch Messung der AGE-Konzentration in Serum und Urin versucht. Verschiedene Verfahren, z.B. die Gaschromatographie, die HPLC (high-performance liquid chromatography) oder die Fluoreszenzspektroskopie dienen der Bestimmung von AGEs (*Berg TJ et al. 1998, Galler et al. 2003*). Im Rahmen dieser Arbeit wurden Imidazolon und Carboxymethyllysin mit einem kompetitiven ELISA bestimmt (*Degenhardt et al. 1997, Franke et al. 2003b, Hein et al. 2003, Stein et al. 2003*). Vorbereitend erfolgte eine Messung der Kreatininkonzentration in Serum und Urin sowie von Albumin und Protein im Urin, um den Schädigungsgrad der Niere zu bestimmen.

Anhand der Laborparameter wurde die Einschränkung der Nierenfunktion für die 25 untersuchten Fälle, darunter 20 Diabetiker und 5 Patienten mit Amyloidose, deutlich. Unter diesem Patientengut befanden sich 14 Personen, bei denen immunhistochemische Untersuchungen durchgeführt wurden, allerdings nur ein Fall mit einer Amyloidose.

Im Vergleich beider Krankheitsbilder wurden lediglich für Kreatinin im Urin höhere Werte bei den Patienten mit diabetischer Nephropathie ermittelt ($p=0,049$). Allerdings lagen alle 5 Amyloidosefälle bezüglich der 4 untersuchten Laborparameter außerhalb des Referenzbereiches, so dass die Nierenfunktionseinschränkung ebenfalls als fortgeschritten angesehen werden muss. In der Gruppe der Diabetiker besteht eine größere Varianz der Messergebnisse. Unter diesen Patienten lagen für Kreatinin im Urin auch einige Fälle im Normbereich.

In beiden Patientengruppen bestand ein gleichartiger Schädigungsgrad der Nieren. Die Konzentrationen der glykierten Endprodukte in Serum und Urin zeigten weder für CML noch für Imidazolon relevante Abweichungen zwischen den Patienten mit einer diabetischen Nephropathie und einer Amyloidose. Im Serum wurden für CML niedrige Werte bestimmt. Im Gegensatz zu den bisher in Studien beschriebenen Fällen, lagen in der Kontrollgruppe von 45 gesunden Personen höhere Messwerte als unter den Erkrankten vor (*Schleicher et al. 1997, Berg TJ et al. 1998, Wagner et al. 2001*). Einen Widerspruch bildet dieses Ergebnis

gegenüber der Aussage, dass Diabetiker mit chronischen Komplikationen, z.B. diabetischer Retinopathie, höhere CML-Spiegel aufweisen als Diabetiker ohne diese Veränderungen (*Hwang et al. 2005*). Eine mögliche Begründung liegt in der starken Bindung von Nε-Carboxymethyllysin an RAGE und dem damit verbundenen geringeren Anteil von freiem, im Serum messbarem CML. Amyloidose und diabetische Nephropathie könnten mit einer verstärkten Interaktion zwischen AGE und RAGE und einer dadurch bedingten geringeren Serumkonzentration der glykierten Endprodukte einhergehen. Durch einen inflammatorischen Stimulus und eine verstärkte Expression von RAGE ist eine verstärkte CML-Bindung mit erhöhter Clearance möglich, wodurch ein Rückgang des CML-Spiegels hervorgerufen wird (*Röcken et al. 2003*).

Imidazolon im Serum zeigte keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen Patienten und der Kontrollgruppe. Angaben über die Konzentration von Imidazolon in Serum und Urin existieren in der Literatur bisher nicht, allerdings wurden für 3-DG (Deoxy-glucosom), einem Vorläufer von Imidazolon, erhöhte Serumspiegel beschrieben (*Niwa 1999*). Auch bei Patienten mit immunhistochemischen Nachweis von Imidazolon fand sich kein Anstieg der Serumspiegel.

Die ähnlichen Werte zwischen den Patienten mit einer diabetischen Nephropathie und einer Amyloidose lassen ein gleichartiges Schädigungsmuster im Bereich der Nieren vermuten. Bedingt durch beide Grunderkrankungen wird unter Anwesenheit von oxidativem Stress die Akkumulation der AGEs gefördert, wodurch Struktur und Funktion des Organs weiter beeinträchtigt werden (*Horie et. al. 1997, Krapfenbauer et. al. 1998, Baynes et. al. 1999*).

Die Gegenüberstellung der AGE-Konzentrationen aus Serum und Urin zeigte für CML in beiden Patientengruppen keine signifikanten Unterschiede, während Imidazolon im Urin eine höhere Konzentration als im Serum aufwies. Sowohl in der Gesamtgruppe ($p < 0,001$) als auch unter den Patienten mit diabetischer Nephropathie ($p < 0,001$) wurden signifikante Differenzen bestimmt. Der freie Anteil von Imidazolon im Blut war vermindert, möglicherweise bedingt durch eine stärkere Akkumulation im Gewebe sowie Ausscheidung über den Urin. Das Fehlen dieses deutlichen Konzentrationsunterschiedes für CML könnte durch eine verringerte Ausscheidung über die Nieren erklärt werden.

In einer weiteren Untersuchung wurden die Zusammenhänge der AGE-Spiegel untereinander sowie in Bezug zu den Laborparametern bestimmt. In der Gruppe der Diabetiker ließ sich eine statistisch signifikante Korrelation zwischen dem CML im Urin und der Proteinurie

($r=0,598$; $p=0,005$) sowie Albuminurie ($r=0,610$; $p=0,004$) feststellen, welche bereits in der Literatur beschrieben wurde (*Friess et al. 2003*). Auch Imidazolon zeigte einen Zusammenhang zu den beiden Urinparametern (Imidazolon im Urin – Proteinurie: $r=0,525$; $p=0,018$ und Imidazolon im Urin – Albuminurie: $r=0,568$; $p=0,009$). Somit wiesen Patienten mit diabetischer Nephropathie eine vom Ausmaß der Proteinurie abhängige Ausscheidung der glykierten Endprodukte auf. Ein Zusammenhang zwischen der Akkumulation und Ausscheidung von CML und Imidazolon kann durch die Korrelation der beiden AGEs im Urin ($r=0,589$; $p=0,006$) angenommen werden.

In der Gruppe der Diabetiker wurden die Zusammenhänge zwischen den Parametern im Urin bestimmt. Im Serum konnte lediglich zwischen Imidazolon und Kreatinin eine statistisch signifikante Beziehung ($r=0,605$; $p=0,005$) ermittelt werden. Die von *Wagner et al. (2001)* beschriebene positive Korrelation zwischen CML und Kreatinin im Serum wurde nicht bestätigt.

Im Gegensatz dazu konnte für die Patienten mit Amyloidose eine Korrelation der AGEs im Serum eruiert werden. CML im Serum zeigte einen positiven Zusammenhang mit der Kreatininkonzentration im Serum ($r=0,900$; $p=0,037$), mit der Imidazolonkonzentration im Serum ($r=0,900$; $p=0,037$) und im Urin ($r=1,000$; $p=0$). Imidazolon im Serum korrelierte mit dem Kreatinin im Serum ($r=1,000$; $p=0$) und Imidazolon im Urin ($r=0,900$; $p=0,037$). Ferner bestand eine signifikante Beziehung zwischen Imidazolon im Urin und Kreatinin im Serum ($r=0,900$; $p=0,037$). Mögliche Ursachen für die bei den Patienten mit diabetischer Nephropathie bestimmten Zusammenhänge der Urinparameter könnten in den höheren Werten für Proteinurie, Albuminurie und AGE-Konzentration im Urin liegen. Diabetiker wiesen nicht signifikant höhere Messwerte für Protein, Albumin, CML und Imidazolon im Urin auf. Eventuell wurde bei diesen Patienten durch eine größere Ausscheidung von Protein und Albumin auch die Ausscheidung der glykierten Endprodukte verstärkt. Die erhöhte Konzentration von CML und Imidazolon im Urin könnte Zeichen einer vermehrten Proteinurie im fortgeschrittenen Stadium der diabetischen Nephropathie sein (*Vlassara et al. 1994*). Die Bestimmung der AGEs im Urin wäre somit als Parameter zur Diagnose und Verlaufskontrolle der diabetesassoziierten Nierenerkrankung denkbar. Diese Hypothese sollte in weiteren Untersuchungen überprüft werden.

Die Progression des nephrotischen Syndroms könnte durch eine Hemmung der Bildung oder eine Zerstörung der AGE-Strukturen aufgehalten werden (*Sano et al. 1998, Khalifah et al.*

1999, Nawroth et al. 1999, Raj et al. 2000, Kalousová et al. 2004). Ob diese Beobachtung auch für Patienten im Frühstadium der Erkrankung zutrifft, konnte anhand der bisherigen Untersuchungen nicht belegt werden. Die meisten von uns untersuchten Patienten wiesen bereits eine fortgeschrittene Nierenschädigung auf. Die Urinausscheidung der AGEs schien bei der Amyloidose eine geringere Rolle zu spielen, obwohl ebenfalls ein nephrotisches Syndrom bestehen kann. Für diese Patientengruppe war ein Zusammenhang zwischen den beiden untersuchten AGEs feststellbar. CML im Serum, Imidazolon im Serum und Imidazolon im Urin zeigten untereinander statistisch signifikante Beziehungen, während CML im Urin mit keinem der genannten Parameter korrelierte. Die Ausscheidung von CML im Urin korrelierte bei der Amyloidose nicht mit der Konzentration von CML und Imidazolon im Serum und diente damit nicht zur Abschätzung der Akkumulation der AGEs im Nierengewebe. Bei der Amyloidose lieferte der Imidazolonwert im Urin aussagekräftigere Ergebnisse.

Grundsätzlich konnten Zusammenhänge zwischen den beiden AGEs in Serum und Urin, den Urin- und Serumkreatininwerten sowie dem Ausmaß der Proteinurie gezeigt werden.

Die Ergebnisse sind mit den Resultaten anderer Studien nicht uneingeschränkt vergleichbar. In dieser Arbeit wurde für die Immunhistochemie ein polyklonaler Antikörper gegen CML verwendet, während die ELISA-Bestimmung mit einem monoklonalen Antikörper durchgeführt wurde (Wagner et al. 2001, Drinda et al. 2002, Galler et al. 2003, Hwang et al. 2005). CML wurde mehrfach als der relevante Ligand am AGE-Rezeptor beschrieben, somit sollte durch die Bindung eines polyklonalen Antikörpers eine Aussage über die CML-Konzentration möglich sein (Kislinger et al. 1999, Tanji et al. 2000). Allerdings ist eine zusätzliche Bindung anderer Epitope nicht sicher auszuschließen, so dass möglicherweise mit einem monoklonalen Antikörper spezifischere Ergebnisse erzielt werden (Berg TJ et al. 1998). Die Ergebnisse aus Immunhistochemie und Laboruntersuchungen sind also nicht vorbehaltlos vergleichbar. Sowohl für die immunhistochemische Darstellung als auch die Konzentrationsbestimmung von Imidazolon stand ein monoklonaler Antikörper zur Verfügung, so dass spezifische Resultate zu erwarten sind (Niwa et al. 1997b, Niwa et al. 1997c).

Die Laborparameter wurden auf eine Beeinflussung durch das Lebensalter der Patienten überprüft. Für die Patienten mit diabetischer Nephropathie konnte keine statistisch relevante Beziehung bestimmt werden. Dieses Ergebnis wurde bereits in vorherigen Studien

beschrieben (*Berg TJ et al. 1998, Wagner et al. 2001*). Die Amyloidosepatienten zeigten eine positive Korrelation zwischen dem Alter und der CML-Konzentration im Urin ($r=0,900$; $p=0,037$). Für CML im Serum sowie Imidazolon in Serum und Urin konnte kein Zusammenhang bestimmt werden. Fraglich ist, ob die Beziehung zwischen CML im Urin und dem Alter auch auf größere Patientenkollektive zutrifft. Neben diesem Aspekt lieferte die Korrelation zwischen der Anzahl der MRP-14 positiv gefärbten Zellen und dem Lebensalter ($r=0,705$; $p=0,010$) einen weiteren Hinweis auf eine mögliche Verbindung von Alter und AGE-Ablagerung bei der Amyloidose. Obwohl in höherem Lebensalter mit einem Anstieg der AGE-Konzentrationen gerechnet werden muss, treten bei chronischen Erkrankungen Einflüsse des jeweiligen Krankheitsbildes in den Vordergrund, so dass die AGE-Akkumulationen nicht mehr entscheidend durch das Lebensalter bestimmt werden dürfte (*Kasper und Funk 2001, Ulrich und Cerami 2001, Vlassara und Palace 2003*). Denkbar wäre allerdings eine additive Wirkung, wie sie anhand der Ergebnisse der Amyloidosegruppe ersichtlich wird.

In einer weiteren Untersuchung wurde die immunhistochemische Anfärbung in Abhängigkeit von der Nierenfunktionseinschränkung bestimmt. *Tanji et al. (2000)* beschrieb eine Korrelation zwischen dem Schweregrad der Nierenschädigung und der Quantität der CML Ablagerungen in tubulärer und glomerulärer Basalmembran sowie in den Mesangiumzellen. Diese Tendenz konnte ebenfalls beobachtet werden. In den immunhistochemischen Untersuchungen von Patienten mit einem Serumkreatinin $>200 \mu\text{mol/l}$ konnte ein höherer prozentualer Anteil an positiven Präparaten für CML, Imidazolon, NF κ B und RAGE festgestellt werden als bei Patienten mit einem Serumkreatinin $<200 \mu\text{mol/l}$.

Abschließend kann festgehalten werden, dass Patienten mit diabetischer Nephropathie und Amyloidose ein in verschiedenen Laborparametern und immunhistochemischen Befunden ähnliches Bild zeigen, welches vermutlich aufgrund eines gleichartigen Schädigungsmusters im Bereich der Nieren hervorgerufen wird. Ferner wurden Argumente für einen Zusammenhang beider AGEs mit RAGE sowie der Aktivierung von NF κ B, verbunden mit einer Expremierung von MRP-14, geliefert. Die beiden glykierten Endprodukte Imidazolon und N ϵ -Carboxymethyllysine zeigen ein gleichartiges Verhalten in Serum, Urin sowie bei deren Akkumulation im Nierengewebe. Die Bedeutung der Advanced Glycation Endproducts

für die Pathogenese beider Erkrankungsbilder wird unterstrichen. Sie können als urämische Toxine angesehen werden, welche die Pathogenese von vaskulären und renalen Komplikationen beeinflussen (*Horie et al. 1997, Raj et al. 2000*). AGEs modifizieren Proteine und führen durch Crosslinkbildung zwischen Geweben, Lipiden und DNA zu einer Schädigung von Struktur und Funktion der Niere (*Jakuš et al. 2004*). Bei Amyloidose wird eine Verbreiterung der Amyloidfibrillen durch Veränderungen der biologischen und biochemischen Bedingungen hervorgerufen (*Röcken et al. 2003*). Lokale Entzündungs- und Immunreaktionen führen zu einer Schädigung von Glomerulus, Tubulusepithel und Interstitium (*Singh et al. 2001, Bohlender et al. 2005*). Arteriosklerotische Veränderungen werden durch Plättchenaggregation, abnormale LDL-Bildung, Störung der Gefäßrelaxation und Modifikation von Matrixproteinen gefördert (*Raj et al. 2000*).

Exakte pathogenetische Prozesse, besonders die Wirkungsweise von Imidazolon sowie die Bedeutung der AGEs bei der Amyloidose für Verlauf, Prognose und Therapie bleiben allerdings ungewiss. Dieser Umstand rechtfertigt die Notwendigkeit der weiteren Forschung auf dem Gebiet der glykierten Endprodukte.

8 Schlussfolgerungen

1. Bei der diabetische Nephropathie und der Amyloidose AA und AL mit Nierenbeteiligung handelt es sich um chronische Erkrankungen, die mit einer inhomogenen Akkumulation von Advanced Glycation Endproducts im Nierengewebe einhergehen und zur Entstehung einer terminalen Niereninsuffizienz beitragen.
2. Die Interaktion von AGEs, Amyloid- β -Peptiden und Mitgliedern der S100-Familie mit dem Rezeptor der AGEs (RAGE) bewirkt eine Freisetzung reaktiver Oxidationsprodukte, die zu einer Aktivierung des nuklearen Transkriptionsfaktors- κ B (NF κ B) führen. Durch nachweisliche Korrelation zwischen NF κ B und MRP-14 wird die Rolle des calziumbindenden Proteins der S100-Familie innerhalb dieser Kausalkette deutlich.
3. Die glykierten Endprodukte CML, Imidazolone sowie deren Rezeptor RAGE und der Transkriptionsfaktor NF κ B sind in Tubuluszellen, Endothelzellen, Mesangiumzellen und im Interstitium der durch Diabetes und Amyloidose geschädigten Nieren nachweisbar.
4. Auffällig ist die Aussparung der Anfärbung in den tubulären Basalmembranen, deren Ursache möglicherweise in der komplexen Struktur der AGE-Ablagerungen gesehen werden kann. Im Interstitium (z.B. innerhalb von Entzündungsinfiltrationen) weist Imidazolone eine höhere Nachweisquote gegenüber CML auf, welches im Mesangium dominiert.
5. Unterschiede zwischen beiden Erkrankungen lassen sich weder im immunhistochemischen Bild noch in den Konzentrationen für Imidazolone und CML in Serum und Urin nachweisen. Die immunhistochemischen Untersuchungen zeigen keine Abhängigkeit von Alter oder Geschlecht des Patienten. Die Laborparameter weisen lediglich in der Amyloidosegruppe eine positive Korrelation zwischen CML im Urin und Alter sowie MRP-14 und dem Alter auf. Die AGE-Akkumulationen führen vermutlich durch ähnliche Schädigungsmechanismen zu einer Verschlechterung der Nierenfunktion.

6. Während zwischen der Serum- und Urinkonzentration für CML keine signifikante Differenz besteht, lassen sich für Imidazolon höhere Spiegel im Urin und damit eine höhere Eliminationsrate über die Nieren aufzeigen.
7. Die Nε-Carboxymethyllysinspiegel sind in beiden Gruppen niedrig, was vermutlich durch die starke Bindung an RAGE und dem folgerichtig geringen Anteil von freiem, im Serum messbaren, CML bedingt ist.
8. Innerhalb der Amyloidosegruppe kann eine positive Korrelation zwischen CML im Serum und den Konzentrationen von Imidazolon in Serum und Urin sowie zwischen CML und Kreatinin im Serum festgestellt werden. CML im Urin weist mit keinem der untersuchten Parameter eine signifikante Beziehung auf. Die Werte von Imidazolon im Serum und Urin korrelieren untereinander und mit dem Kreatinin im Serum.
9. Die Patienten mit Diabetes mellitus zeigen einen direkten Zusammenhang zwischen der CML- bzw. Imidazolonkonzentration und der Albumin- und Proteinurie. Weiterhin besteht eine signifikante Korrelation zwischen Imidazolon und CML im Urin. Diese beiden Aspekte konnten für Patienten mit Amyloidose nicht nachgewiesen werden.

Literatur- und Quellenverzeichnis

- (1) Ahmed MU, Thorpe SR, Baynes JW. 1986. Identification of N epsilon-carboxymethyllysine as a degradation product of fructoselysine in glycated protein. *J Biol Chem*, 26:4889-4894.
- (2) Ando K, Beppu M, Kikugawa K, Nagai R, Horiuchi S. 1999. Membrane proteins of human erythrocytes are modified by advanced glycation end products during aging in the circulation. *Biochem Biophys Res Commun*, 258:123-127.
- (3) Araki N, Ueno N, Chakrabarti B, Morino Y, Horiuchi S. 1992. Immunochemical evidence for the presence of advanced glycation end products in human lens proteins and its positive correlation with aging. *J Biol Chem*, 267:10211-10214.
- (4) Bar KJ, Franke S, Wenda B, Muller S, Kientsch-Engel R, Stein G, Sauer H. 2003. Pentosidine and N(epsilon)-(carboxymethyl)-lysine in Alzheimer's disease and vascular dementia. *Neurobiol Aging*, 24:333-338.
- (5) Barnes PJ. 1997. Nuclear factor-kappa B. *Int J Biochem Cell Biol*, 29:867-870.
- (6) Bayer TA, Paliga K, Weggen S, Wiestler OD, Beyreuther K, Multhaup G. 1997. Amyloid precursor-like protein 1 accumulates in neuritic plaques in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol*, 94:519-524.
- (7) Baynes JW, Thorpe SR. 1999. Role of oxidative stress in diabetic complications: a new perspective on an old paradigm. *Diabetes*, 48:1-9.

- (8) Berg TJ, Clausen JT, Torjesen PA, Dahl-Jorgensen K, Bangstad HJ, Hanssen KF. 1998. The advanced glycation end product N ϵ -(carboxymethyl)lysine is increased in serum from children and adolescents with type 1 diabetes. *Diabetes Care*, 21:1997-2002.
- (9) Berg UB, Torbjornsdotter TB, Jaremko G, Thalme B. 1998. Kidney morphological changes in relation to long-term renal function and metabolic control in adolescents with IDDM. *Diabetologia*, 41:1047-1056.
- (10) Bierhaus A, Hofmann MA, Ziegler R, Nawroth PP. 1998. AGEs and their interaction with AGE-receptors in vascular disease and diabetes mellitus I. The AGE concept. *Cardiovasc Res*, 37:586-600.
- (11) Bierhaus A, Schiekofer S, Schwaninger M, Andrassy M, Humpert PM, Chen J, Hong M, Luther T, Henle T, Kloting I, Morcos M, Hofmann M, Tritschler H, Weigle B, Kasper M, Smith M, Perry G, Schmidt AM, Stern DM, Haring HU, Schleicher E, Nawroth PP. 2001. Diabetes-associated sustained activation of the transcription factor nuclear factor-kappaB. *Diabetes*, 50:2792-2808.
- (12) Bohlender JM, Franke S, Stein G, Wolf G. 2005. Advanced glycation end products and the kidney. *Am J Physiol Renal Physiol*, 289:F645-659.
- (13) Botto M, Hawkins PN, Bickerstaff MC, Herbert J, Bygrave AE, McBride A, Hutchinson WL, Tennent GA, Walport MJ, Pepys MB. 1997. Amyloid deposition is delayed in mice with targeted deletion of the serum amyloid P component gene. *Nat Med*, 3:855-859.
- (14) Bourcier T, Sukhova G, Libby P. 1997. The nuclear factor kappa-B signaling pathway participates in dysregulation of vascular smooth muscle cells in vitro and in human atherosclerosis. *J Biol Chem*, 272:15817-15824.

- (15) Brancaccio D, Gallieni M, Niwa T, Braidotti P, Coggi G. 2000. Ultrastructural localization of advanced glycation end products and beta2-microglobulin in dialysis amyloidosis. *J Nephrol*, 13:129-136.
- (16) Brownlee M, Vlassara H, Cerami A. 1984. Nonenzymatic glycosylation and the pathogenesis of diabetic complications. *Ann Intern Med*, 101:527-537
- (17) Busch M, Franke S, Mueller A, Wolf M, Gerth J, Ott U, Niwa T, Stein G. 2004. Potential cardiovascular risk factors in chronic kidney disease: AGEs, total homocysteine and metabolites, and the C-reactive protein. *Kidney Int*, 66:338-347.
- (18) Buxbaum J. 1992. Mechanisms of disease: monoclonal immunoglobulin deposition. Amyloidosis, light chain deposition disease, and light and heavy chain deposition disease. *Hematol Oncol Clin North Am*, 6:323-346.
- (19) Cacoub P, Axler O, De Zuttere D, Hausfater P, Amoura Z, Walter S, Wechsler B, Godeau P, Piette JC. 2000. Amyloidosis and cardiac involvement. *Ann Med Interne*, 151:611-617.
- (20) Caramori ML, Mauer M. 2003. Diabetes and nephropathy. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 12:273-282.
- (21) Carbonin P, Cocchi A, Zuccala G, Menichelli P. 1990. Heart aging and its clinical implications. *Recenti Prog Med*, 81:215-220.
- (22) Cerami C, Founds H, Nicholl I, Mitsuhashi T, Giordano D, Vanpatten S, Lee A, Al-Abed Y, Vlassara H, Bucala R, Cerami A. 1997. Tobacco smoke is a source of toxic reactive glycation products. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94:13915-13920.

- (23) Chen JR, Takahashi M, Suzuki M, Kushida K, Miyamoto S, Inoue T. 1999. Comparison of the concentrations of pentosidine in the synovial fluid, serum and urine of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Rheumatology*, 38:1275-1278.
- (24) Clark A, Charge SB, Badman MK, MacArthur DA, de Koning EJ. 1996. Islet amyloid polypeptide: actions and role in the pathogenesis of diabetes. *Biochem Soc Trans*, 24:594-599.
- (25) Dalla Vestra M, Saller A, Bortoloso E, Mauer M, Fioretto P. 2000. Structural involvement in type 1 and type 2 diabetic nephropathy. *Diabetes Metab*, 26 (Suppl 4):8-14.
- (26) Dammacco F. 1991. Amyloidosis: clinical picture, immunological and biomolecular features, treatment prospects. *Ann Ital Med Int*. 6:107-116.
- (27) Dawczynski J, Franke S, Blum M, Kasper M, Stein G, Strobel J. 2002. Advanced glycation end-products in corneas of patients with keratoconus. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 240:296-301.
- (28) Deckert T. 1994. Nephropathy and coronary death - the fatal twins in diabetes mellitus. *Nephrol Dial Transplant*, 9:1069-1071.
- (29) Degenhardt TP, Grass L, Reddy S, Thorpe SR, Diamandis EP, Baynes JW. 1997. Technical note. The serum concentration of the advanced glycation end-product N ϵ -(carboxymethyl)lysine is increased in uremia. *Kidney Int*, 52:1064-1067.
- (30) Deuther-Conrad W, Franke S, Sommer M, Henle T, Stein G. 2001. Differences in the modulating potential of advanced glycation end products (AGE) peptides versus AGE proteins. *Kidney Int*, 59 (Suppl 78):63-66.

- (31) Drinda S, Franke S, Canet CC, Petrow P, Brauer R, Huttich C, Stein G, Hein G. 2002. Identification of the advanced glycation end products N(epsilon)-carboxymethyllysine in the synovial tissue of patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*, 61:488-492.
- (32) Drinda S, Franke S, Rüster M, Petrow P, Pullig O, Stein G, Hein G. 2005. Identification of the receptor for advanced glycation end products in synovial tissue of patients with rheumatoid arthritis. *Rheumtol Int*, 25:411-413.
- (33) Drueke TB. 1999. Extraskeletal problems and amyloid. *Kidney Int*, 56 (Suppl 73):89-93.
- (34) Ellis RD, Goodlad JR, Limb GA, Powell JJ, Thompson RP, Punchard NA. 1998. Activation of nuclear factor kappa B in Crohn's disease. *Inflamm Res*, 47:440-445.
- (35) Fioretto P, Caramori ML, Dalla Vestra M, Mauer M. 2001. Risk predictors in patients with diabetic nephropathy. *Curr Diab Rep*, 1:245-250.
- (36) Franke S, Dawczynski J, Strobel J, Niwa T, Stahl P, Stein G. 2003c. Increased levels of advanced glycation endproducts in human cataractous lenses. *J Cataract Refract Surg*, 29:998-1004.
- (37) Franke S, Müller A, Sommer M, Busch M, Kientsch-Engel R, Stein G. 2003b. Serum levels of total homocysteine, homocysteine metabolites and of advanced glycation end-products (AGEs) in patients after renal transplantation. *Clin Nephrol*, 59:88-97.
- (38) Franke S, Stein F, Dawczynski J, Blum M, Kubetschka U, Stein G, Strobel J. 2003a. Advanced glycation endproducts in the anterior chamber aqueous of cataractous patients. *J Cataract Refract Surg*, 29:329-335.

- (39) Frosch M, Strey A, Vogl T, Wulffraat NM, Kuis W, Sunderkotter C, Harms E, Sorg C, Roth J. 2000. Myeloid-related proteins 8 and 14 are specifically secreted during interaction of phagocytes and activated endothelium and are useful markers for monitoring disease activity in pauciarticular-onset juvenile rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 43:628-637.

- (40) Friess U, Waldner W, Wahl HG, Lehmann R, Haring HU, Voelter W, Schleicher E. 2003. Liquid chromatography-based determination of urinary free and total N ϵ -(carboxymethyl)lysine excretion in normal and diabetic subjects. *J Chromatogr B Anylyt Technol Biomed Life Sci*, 794:273-280.

- (41) Frye EB, Degenhardt TP, Thorpe SR, Baynes JW. 1998. Role of the Maillard reaction in aging of tissue proteins. Advanced glycation end product-dependent increase in imidazolium cross-links in human lens proteins. *J Biol Chem*, 273:18714-18719.

- (42) Fu MX, Requena JR, Jenkins AJ, Lyons TJ, Baynes JW, Thorpe SR. 1996. The advanced glycation end product, N ϵ -(carboxymethyl)lysine, is a product of both lipid peroxidation and glycoxidation reactions. *J Biol Chem*, 271:9982-9986.

- (43) Fu MX, Wells-Knecht KJ, Blackledge JA, Lyons TJ, Thorpe SR, Baynes JW. 1994. Glycation, glycoxidation, and cross-linking of collagen by glucose. Kinetics, mechanisms, and inhibition of late stages of the Maillard reaction. *Diabetes*, 43:676-683.

- (44) Galler A, Müller G, Schinzel R, Kratzsch J, Kiess W, Münch G. 2003. Impact of metabolic control and serum lipids on the concentration of advanced glycation end products in the serum of children and adolescents with type 1 diabetes, as determined by fluorescence spectroscopy and N ϵ -(carboxymethyl)lysine ELISA. *Diabetes Care*, 26:2609-2615.

- (45) Gejyo F, Yamada T, Odani S, Nakagawa Y, Arakawa M, Kunitomo T, Kataoka H, Suzuki M, Hirasawa Y, Shirahama T, et al. 1985. A new form of amyloid protein associated with chronic hemodialysis was identified as beta 2-microglobulin. *Biochem Biophys Res Commun*, 129:701-706.
- (46) Glomb MA, Monnier VM. 1995. Mechanism of protein modification by glyoxal and glycolaldehyde, reactive intermediates of the Maillard reaction. *J Biol Chem*, 270:10017-10026.
- (47) Hader C, Plum J. 2002. Diabetische Nephropathie – Diagnostik. *Dtsch Med Wochenschr*, 127:1324-1327.
- (48) Hammes HP, Alt A, Niwa T, Clausen JT, Bretzel RG, Brownlee M, Schleicher ED. 1999. Differential accumulation of advanced glycation end products in the course of diabetic retinopathy. *Diabetologia*, 42:728-736.
- (49) Hasslacher C. 2002. Diabetische Nephropathie - Klassifikation, Diagnose und Prävention. *Cardiovasc*, 2:8-17.
- (50) Hein G, Kohler M, Oelzner P, Stein G, Franke S. 2005. The advanced glycation end product pentosidine correlates to IL-6 and other relevant inflammatory markers in rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int* 26, 137-141.
- (51) Hein G, Wiegand R, Lehmann G, Stein G, Franke S. 2003. Advanced glycation end-products pentosidine and N epsilon-carboxymethyllysine are elevated in serum of patients with osteoporosis. *Rheumatology*, 42:1242-1246.
- (52) Hessian PA, Edgeworth J, Hogg N. 1993. MRP-8 and MRP-14, two abundant Ca(2+)-binding proteins of neutrophils and monocytes. *J Leukoc Biol*, 53:197-204.

- (53) Hessian PA, Fisher L. 2001. The heterodimeric complex of MRP-8 (S100A8) and MRP-14 (S100A9). Antibody recognition, epitope definition and the implications for structure. *Eur J Biochem*, 268:353-363.
- (54) Hobbs JA, May R, Tanousis K, McNeill E, Mathies M, Gebhardt C, Henderson R, Robinson MJ, Hogg N. 2003. Myeloid cell function in MRP-14 (S100A9) null mice. *Mol Cell Biol*, 23:2564-2576.
- (55) Hofmann MA, Drury S, Fu C, Qu W, Taguchi A, Lu Y, Avila C, Kambham N, Bierhaus A, Nawroth P, Neurath MF, Slattey T, Beach D, McClary J, Nagashima M, Morser J, Stern D, Schmidt AM. 1999b. RAGE mediates a novel proinflammatory axis: a central cell surface receptor for S100/calgranulin polypeptides. *Cell*, 97:889-901.
- (56) Hofmann MA, Schiekofer S, Isermann B, Kanitz M, Henkels M, Joswig M, Treusch A, Morcos M, Weiss T, Borcea V, Abdel Khalek AK, Amiral J, Tritschler H, Ritz E, Wahl P, Ziegler R, Bierhaus A, Nawroth PP. 1999a. Peripheral blood mononuclear cells isolated from patients with diabetic nephropathy show increased activation of the oxidative-stress sensitive transcription factor NF-kappaB. *Diabetologia*, 42:222-232.
- (57) Horie K, Miyata T, Maeda K, Miyata S, Sugiyama S, Sakai H, van Ypersole de Strihou C, Monnier VM, Witztum JL, Kurakawa K. 1997. Immunohistochemical colocalization of glycoxidation products and lipid peroxidation products in diabetic renal glomerular lesions. Implication for glycoxidative stress in the pathogenesis of diabetic nephropathy. *J Clin Invest*, 100:2995-3004.
- (58) Hoshii Y, Kawano H, Gondo T, Takahashi M, Ishihara T, Higuchi K, Horiuchi S. 1996. Immunohistochemical study with anti-advanced glycation end-products antibody in murine amyloidosis. *Pathol Int*, 46:738-742.

- (59) Hwang JS, Shin CH, Yang SW. 2005. Clinical implications of Nε-(carboxymethyl)lysine, advanced glycation end product, in children and adolescents with type 1 diabetes. *Diabetes Obes Metab*, 7:263-267.
- (60) Iida Y, Miyata T, Inagi R, Sugiyama S, Maeda K. 1994. Beta 2-microglobulin modified with advanced glycation end products induces interleukin-6 from human macrophages: role in the pathogenesis of hemodialysis-associated amyloidosis. *Biochem Biophys Res Commun*, 201:1235-1241.
- (61) Jadoul M, Garbar C, Noel H, Sennesael J, Vanholder R, Bernaert P, Rorive G, Hanique G, van Ypersele de Strihou C. 1997. Histological prevalence of beta 2-microglobulin amyloidosis in hemodialysis: a prospective post-mortem study. *Kidney Int*, 51:1928-1932.
- (62) Jakuš V, Rietbrock N. 2004. Advanced glycation end-products and the progress of diabetic vascular complications. *Physiol Res*, 53:131-142.
- (63) Jeanmaire C, Danoux L, Pauly G. 2001. Glycation during human dermal intrinsic and actinic ageing: an in vivo and in vitro model study. *Br J Dermatol*, 145:10-18.
- (64) Kahn SE, Andrikopoulos S, Verchere CB. 1999. Islet amyloid: a long-recognized but underappreciated pathological feature of type 2 diabetes. *Diabetes*, 48:241-253.
- (65) Kalousová M, Zima T, Tesar V, Stipek S, Sulkova S. 2004. Advanced glycation end products in clinical nephrology. *Kidney Blood Press Res*, 27:18-28.
- (66) Kasper M, Funk RH. 2001. Age-related changes in cells and tissues due to advanced glycation end products (AGEs). *Arch Gerontol Geriatr*, 32:233-243.

- (67) Keil E, Hrsg. 2000. Klinische Chemie systematisch. Erste Aufl. Bremen: UNI-MED Verlag, 197-198.
- (68) Khalifah RG, Baynes JW, Hudson BG. 1999. Amadorins: novel post-Amadori inhibitors of advanced glycation reactions. *Biochem Biophys Res Commun*, 257: 251-258.
- (69) Kimmelstiel P, Wilson C. 1936. Intercapillary lesions in the glomeruli of the kidney. *Am J Pathol*, 12:83-97.
- (70) Kimura T, Ikeda K, Takamatsu J, Miyata T, Sobue G, Miyakawa T, Horiuchi S. 1996. Identification of advanced glycation end products of the Maillard reaction in Pick's disease. *Neurosci Lett*, 219:95-98.
- (71) Kisilevsky R. 1992. Proteoglycans, glycosaminoglycans, amyloid-enhancing factor, and amyloid deposition. *J Int Med*, 232:515-516.
- (72) Kisilevsky R, 2000. Amyloids: Tombstone or triggers ? *Nature America Inc*, 6:633-634.
- (73) Kislinger T, Fu C, Huber B, Qu W, Taguchi A, Du Yan S, Hofmann M, Yan SF, Pischetsrieder M, Stern D, Schmidt AM. 1999. N(epsilon)-(carboxymethyl)lysine adducts of proteins are ligands for receptor for advanced glycation end products that activate cell signaling pathways and modulate gene expression. *J Biol Chem*, 274:31740-31749.
- (74) Kohlhagen J, Kelly J. 2003. Prevalence of vascular risk factors and vascular disease in predialysis chronic renal failure. *Nephrology*, 8:274-279.

- (75) Koschinsky T, He CJ, Mitsuhashi T, Bucala R, Liu C, Buenting C, Heitmann K, Vlassara H. 1997. Orally absorbed reactive glycation products (glycotoxins): an environmental risk factor in diabetic nephropathy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94:6474-6479.
- (76) Krapfenbauer K, Birnbacher R, Vierhapper H, Herkner K, Kampel D, Lubec G. 1998. Glycooxidation, and protein and DNA oxidation in patients with diabetes mellitus. *Clin Sci*, 95:331-337.
- (77) Kume S, Takeya M, Mori T, Araki N, Suzuki H, Horiuchi S, Kodama T, Miyauchi Y, Takahashi K. 1995. Immunohistochemical and ultrastructural detection of advanced glycation end products in atherosclerotic lesions of human aorta with a novel specific monoclonal antibody. *Am J Pathol*, 147:654-667.
- (78) Lander HM, Tauras JM, Ogiste JS, Hori O, Moss RA, Schmidt AM. 1997. Activation of the receptor for advanced glycation and products triggers a p21(ras)-dependent mitogen-activated protein kinase pathway regulated by oxidant stress. *J Biol Chem*, 272:17810-17814.
- (79) Linke RP, Altland K, Ernst J, Gerhard L, Michels H, Saeger W, Willig F. 1998. Praktische Hinweise zur Diagnostik und Therapie generalisierter Amyloidosen. *Dt Ärztebl*, 95:A-2626-2636
- (80) Mansell A, Braun L, Cossart P, O'Neill LA. 2000. A novel function of InlB from *Listeria monocytogenes*: activation of NF-kappaB in J774 macrophages. *Cell Microbiol*, 2:127-136.
- (81) Matsuse T, Ohga E, Teramoto S, Fukayama M, Nagai R, Horiuchi S, Ouchi Y. 1998. Immunohistochemical localisation of advanced glycation end products in pulmonary fibrosis. *J Clin Pathol*, 51:515-519.

- (82) Melkonyan H, Hofmann HA, Nacken W, Sorg C, Klempt M. 1998. The gene encoding the myeloid-related protein 14 (MRP14), a calcium-binding protein expressed in granulocytes and monocytes, contains a potent enhancer element in the first intron. *J Biol Chem*, 273:27026-27032.
- (83) Meng J, Sakata N, Imanaga Y, Takebayashi S, Nagai R, Horiuchi S. 2000. Carboxymethyllysine in dermal tissue of diabetic and nondiabetic patients with chronic renal failure: relevance to glycoxidation damage. *Nephron*, 88:30-35.
- (84) Mercurio F, Manning AM. 1999. NF-kappaB as a primary regulator of the stress response. *Oncogene*, 18:6163-6171.
- (85) Merlini G, Bellotti V. 2003. Molecular mechanisms of amyloidosis. *N Engl J Med*, 349:583-596.
- (86) Mezzano SA, Barria M, Droguett MA, Burgos ME, Ardiles LG, Flores C, Egido J. 2001. Tubular NF-kappaB and AP-1 activation in human proteinuric renal disease. *Kidney Int*, 60:1366-1377.
- (87) Miyata T, Hori O, Zhang J, Yan SD, Ferran L, Iida Y, Schmidt AM. 1996a. The receptor for advanced glycation end products (RAGE) is a central mediator of the interaction of AGE-beta2microglobulin with human mononuclear phagocytes via an oxidant-sensitive pathway. Implications for the pathogenesis of dialysis-related amyloidosis. *J Clin Invest*, 98:1088-1094.
- (88) Miyata T, Ishiguro N, Yasuda Y, Ito T, Nangaku M, Iwata H, Kurokawa K. 1998b. Increased pentosidine, an advanced glycation end product, in plasma and synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis and its relation with inflammatory markers. *Biochem Biophys Res Commun*, 244:45-49.

- (89) Miyata T, Kawai R, Taketomi S, Sprague SM. 1996b. Possible involvement of advanced glycation end-products in bone resorption. *Nephrol Dial Transplant*, 11 (Suppl 5):54-57.
- (90) Miyata T, Oda O, Inagi R, Iida Y, Araki N, Yamada N, Horiuchi S, Taniguchi N, Maeda K, Kinoshita T. 1993. β_2 -Microglobulin modified with advanced glycation end products is a major component of hemodialysis-associated amyloidosis. *J Clin Invest*, 92:1243-1252.
- (91) Miyata T, Ueda Y, Horie K, Nangaku M, Tanaka S, van Ypersele de Strihou C, Kurokawa K. 1998a. Renal catabolism of advanced glycation end products: the fate of pentosidine. *Kidney Int*, 53:416-422.
- (92) Miyata T, Ueda Y, Saito A, Kurokawa K. 2000. 'Carbonyl stress' and dialysis-related amyloidosis. *Nephrol Dial Transplant*, 15 (Suppl 1):25-28.
- (93) Mizutani K, Ono T, Ikeda K, Kayashima K, Horiuchi S. 1997. Photo-enhanced modification of human skin elastin in actinic elastosis by N(epsilon)-(carboxymethyl)lysine, one of the glycoxidation products of the Maillard reaction. *J Invest Dermatol*, 108:797-802.
- (94) Mogensen CE, Christensen CK, Vittinghus E. 1983. The stages in diabetic renal disease. With emphasis on the stage of incipient diabetic nephropathy. *Diabetes*, 32 (Suppl 2):64-78.
- (95) Molitch ME, De Fronzo RA, Franz MJ, Keane WF, Mogensen CE, Parving HH. 2003. Diabetic nephropathy. American Diabetes Association. *Diabetes Care*, 26 (Suppl 1):94-98.

- (96) Münch G, Schinzel R, Loske C, Wong A, Durany N, Li JJ, Vlassara H, Smith MA, Perry G, Riederer P. 1998. Alzheimer's disease - synergistic effects of glucose deficit, oxidative stress and advanced glycation endproducts. *Journal of neural transmission*, 105:439-461.
- (97) Nawroth PP, Bierhaus A, Vogel GE, Hofmann MA, Zumbach M, Wahl P, Ziegler R. 1999. Nichtenzymatische Glykierung und oxidativer Stress bei chronischen Erkrankungen und Diabetes mellitus. *Med Klin*, 94:29-38.
- (98) Newton RA, Hogg N. 1998. The human S100 protein MRP-14 is a novel activator of the beta 2 integrin Mac-1 on neutrophils. *J Immunol*, 160:1427-1435.
- (99) Nicholl ID, Bucala R. 1998. Advanced glycation endproducts and cigarette smoking. *Cell Mol Biol*, 44:1025-1033.
- (100) Nishino T, Horii Y, Shiiki H, Yamamoto H, Makita Z, Bucala R, Dohi K. 1995. Immunohistochemical detection of advanced glycosylation end products within the vascular lesions and glomeruli in diabetic nephropathy. *Hum Pathol*, 26:308-313
- (101) Niwa T, Katsuzaki T, Ishizaki Y, Hayase F, Miyazaki T, Uematsu T, Tatemichi N, Takei Y. 1997c. Imidazolone, a novel advanced glycation end product, is present at high levels in kidneys of rats with streptozotocin-induced diabetes *FEBS Lett*, 407:297-302.
- (102) Niwa T, Katsuzaki T, Miyazaki S, Miyazaki T, Ishizaki Y, Hayase F, Tatemichi N, Takei Y. 1997b. Immunohistochemical detection of Imidazolone, a novel advanced glycation end product, in kidneys and aortas of diabetic patients. *J Clin Invest*, 99:1272-1280.

- (103) Niwa T, Katsuzaki T, Miyazaki S, Momoi T, Akiba T, Miyazaki T, Nokura K, Hayase F, Tatemichi N, Takei Y. 1997a. Amyloid beta 2-microglobulin is modified with imidazolone, a novel advanced glycation end product, in dialysis-related amyloidosis. *Kidney Int*, 51:187-194.
- (104) Niwa T. 1999. 3-Deoxyglucosone: metabolism, analysis, biological activity, and clinical implication. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, 731:23-36.
- (105) Niwa T. 2001. Dialysis-related amyloidosis: pathogenesis focusing on AGE modification. *Semin Dial*, 14:123-126.
- (106) Noll S, Schaub-Kuhnen S. 2000. *Praxis der Immunhistochemie*. München, Jena: Urban & Fischer, 52-53.
- (107) O'Brien J, Morrissey PA. Nutritional and toxicological aspects of the Maillard browning reaction in foods. 1989. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 28:211-248.
- (108) Odink K, Cerletti N, Bruggen J, Clerc RG, Tarcsay L, Zwadlo G, Gerhards G, Schlegel R, Sorg C. 1987. Two calcium-binding proteins in infiltrate macrophages of rheumatoid arthritis. *Nature*, 330:80-82.
- (109) Osterby R, Hartmann A, Bangstad HJ. 2002. Structural changes in renal arterioles in Type I diabetic patients. *Diabetologia*, 45:542-549.
- (110) Phillips AO, Steadman R. 2002. Diabetic nephropathy: the central role of renal proximal tubular cells in tubulointerstitial injury. *Histol Histopathol*, 17:247-252.
- (111) Plum J, Hader C. 2002. Diabetische Nephropathie - Therapie. *Dtsch Med Wochenschr*, 127:1328-1332.

- (112) Pokupec R, Kalauz M, Turk N, Turk Z. 2003. Advanced glycation endproducts in human diabetic and non-diabetic cataractous lenses. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 241:378-384.
- (113) Puchtler H, Sweat F, Levine M. 1962. On the binding of Congo red by amyloid. *J Histochem Cytochem*, 10:355-364.
- (114) Raj DS, Choudhury D, Welbourne TC, Levi M. 2000. Advanced glycation end products: a Nephrologist's perspective. *Am J Kidney Dis*, 35:365-380.
- (115) Rammes A, Roth J, Goebeler M, Klempt M, Hartmann M, Sorg C. 1997. Myeloid-related protein (MRP) 8 and MRP14, calcium-binding proteins of the S100 family, are secreted by activated monocytes via a novel, tubulin-dependent pathway. *J Biol Chem*, 272:9496-9502.
- (116) Röcken C, Kientsch-Engel R, Mansfeld S, Stix B, Stubenrauch K, Weigle B, Buhling F, Schwan M, Saeger W. 2003. Advanced glycation end products and receptor for advanced glycation end products in AA amyloidosis. *Am J Pathol*, 162:1213-1220.
- (117) Roth J, Teigelkamp S, Wilke M, Grun L, Tummler B, Sorg C. 1992. Complex pattern of the myelo-monocytic differentiation antigens MRP8 and MRP14 during chronic airway inflammation. *Immunobiology*, 186:304-314.
- (118) Saeger W, Röcken C. 1998. Amyloid: Mikroskopischer Nachweis, Klassifikation und klinischer Bezug. *Pathologe*, 19:345-354.
- (119) Sano H, Higashi T, Matsumoto K, Melkko J, Jinnouchi Y, Ikeda K, Ebina Y, Makino H, Smedsrod B, Horiuchi S. 1998. Insulin enhances macrophage scavenger receptor-mediated endocytic uptake of advanced glycation end products. *J Biol Chem*, 273:8630-8637.

- (120) Sasaki N, Fukatsu R, Tsuzuki K, Hayashi Y, Yoshida T, Fujii N, Koike T, Wakayama I, Yanagihara R, Garruto R, Amano N, Makita Z. 1998. Advanced glycation end products in Alzheimer's disease and other neurodegenerative diseases. *Am J Pathol*, 153:1149-1155.
- (121) Saxena P, Saxena AK, Cui XL, Obrenovich M, Gudipaty K, Monnier VM. 2000. Transition metal-catalyzed oxidation of ascorbate in human cataract extracts: possible role of advanced glycation end products. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 41:1473-1481.
- (122) Scheler F, Weber MH, Braun N. 1992. Nierenamyloidose. In: Siegenthaler W, Kaufmann W, Hornbostel H, Waller HD, Hrsg. *Lehrbuch Innere Medizin*. Dritte Aufl. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag, 513-515.
- (123) Schleicher ED, Wagner E, Nerlich AG. 1997. Increased accumulation of the glycoxidation product N ϵ -(carboxymethyl)lysine in human tissues in diabetes and aging. *J Clin Invest*, 99:457-468.
- (124) Schiel R, Franke S, Appel T, Voigt U, Ross IS, Kientsch-Engel R, Muller UA, Stein G. 2004. Improvement of the quality of diabetes control and decrease in the concentrations of AGE-products in patients with type 1 and insulin-treated type 2 diabetes mellitus: results from a 10 year-prospective, population-based survey on the quality of diabetes care in Germany (JEVIN). *Eur J Med Res*, 9:391-399.
- (125) Schmidt AM, Hori O, Cao R, Yan SD, Brett J, Wautier JL, Ogawa S, Kuwabara K, Matsumoto M, Stern D. 1996. RAGE: a novel cellular receptor for advanced glycation end products. *Diabetes*, 45 (Suppl 3):77-80.
- (126) Schmidt AM, Yan SD, Yan SF, Stern DM. 2001. The multiligand receptor RAGE as a progression factor amplifying immune and inflammatory responses. *J Clin Invest*, 108:949-955.

- (127) Shibata N, Nagai R, Miyata S, Jono T, Horiuchi S, Hirano A, Kato S, Sasaki S, Asayama K, Kobayashi M. 2000. Nonoxidative protein glycation is implicated in familial amyotrophic lateral sclerosis with superoxide dismutase-1 mutation. *Acta Neuropathol*, 100:275-284.
- (128) Shumway JT, Gambert SR. 2003. Diabetic nephropathy - pathophysiology and management. *Int Urol Nephrol*, 34:257-264.
- (129) Singh R, Barden A, Mori T, Beilin L. 2001. Advanced glycation end-products: a review. *Diabetologia*, 44:129-146.
- (130) Srikrishna G, Huttunen HJ, Johansson L, Weigle B, Yamaguchi Y, Rauvala H, Freeze HH. 2002. *N*-Glycans on the receptor for advanced glycation end products influence amphotericin binding and neurite outgrowth. *J Neurochem*, 80:998-1008.
- (131) Stallmach A, Giese T, Schmidt C, Ludwig B, Mueller-Molaian I, Meuer SC. 2004. Cytokine/chemokine transcript profiles reflect mucosal inflammation in Crohn's disease. *Int J Colorectal Dis*, 19:308-315.
- (132) Stein G, Busch M, Müller A, Wendt T, Franke C, Niwa T, Franke S. 2003. Are advanced glycation end products risk factors in patients with CRF ? *Am J Kidney Dis*, 41(Suppl 1):S52-S56.
- (133) Stern D, Yan SD, Yan SF, Schmidt AM. 2002. Receptor for advanced glycation endproducts: a multiligand receptor magnifying cell stress in diverse pathologic settings. *Adv Drug Deliv Rev*, 54:1615-1625.
- (134) Stevens A. 1998. The contribution of glycation to cataract formation in diabetes. *J Am Optom Assoc*, 69:519-530.
- (135) Struck HG, Heider C, Lautenschlager C. 2001. Is diabetes in the elderly patient a risk factor for cataracts? *Ophthalmologe*, 98:952-955.

- (136) Suzuki D, Miyata T, Saotome N, Horie K, Inagi R, Yasuda Y, Uchida K, Izuhara Y, Yagame M, Sakai H, Kurokawa K. 1999. Immunohistochemical evidence for an increased oxidative stress and carbonyl modification of proteins in diabetic glomerular lesions. *J Am Soc Nephrol*, 10:822-832.
- (137) Takahashi M, Suzuki M, Kushida K, Miyamoto S, Inoue T. 1997. Relationship between pentosidine levels in serum and urine and activity in rheumatoid arthritis. *Br J Rheumatol*, 36:637-642.
- (138) Takeda A, Yasuda T, Miyata T, Goto Y, Wakai M, Watanabe M, Yasuda Y, Horie K, Inagaki T, Doyu M, Maeda K, Sobue G. 1998. Advanced glycation end products co-localized with astrocytes and microglial cells in Alzheimer's disease brain. *Acta Neuropathol*, 95:555-558.
- (139) Tanji N, Markowitz GS, Fu C, Kislinger T, Taguchi A, Pischetsrieder M, Stern D, Schmidt AM, D'Agati VD. 2000. Expression of advanced glycation end products and their cellular receptor RAGE in diabetic nephropathy and nondiabetic renal disease. *Am Soc Nephrol*, 11:1656-1666.
- (140) Teigelkamp S, Bhardwaj RS, Roth J, Meinardus-Hager G, Karas M, Sorg C. 1991. Calcium-dependent complex assembly of the myeloid differentiation proteins MRP-8 and MRP-14. *J Biol Chem*, 266:13462-13467.
- (141) Thornalley PJ. 1998. Cell activation by glycated proteins. AGE receptors, receptor recognition factors and functional classification of AGEs. *Cell Mol Biol*, 44:1013-1023.
- (142) Tobe SW, McFarlane PA, Naimark DM. 2002. Microalbuminuria in diabetes mellitus. *CMAJ*, 167:499-503.

- (143) Uesugi N, Sakata N, Horiuchi S, Nagai R, Takeya M, Meng J, Saito T, Takebayashi S. 2001. Glycooxidation-modified macrophages and lipid peroxidation products are associated with the progression of human diabetic nephropathy. *Am J Kidney Dis*, 38:1016-1025.

- (144) Uesugi N, Sakata N, Nagai R, Jono T, Horiuchi S, Takebayashi S. 2000. Glycooxidative modification of AA amyloid deposits in renal tissue. *Nephrol Dial Transplant*, 15:355-365.

- (145) Ulrich P, Cerami A. Protein glycation, diabetes, and aging. 2001. *Recent Prog Horm Res*, 56:1-21.

- (146) Vlassara H, Striker LJ, Teichberg S, Fuh H, Li YM, Steffes M. 1994. Advanced glycation end products induce glomerular sclerosis and albuminuria in normal rats. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91:11704-11708.

- (147) Vlassara H, Palace MR. Glycooxidation: the menace of diabetes and aging. 2003. *Mt Sinai J Med*, 70:232-241.

- (148) Wagner Z, Wittmann I, Mazak I, Schinzel R, Heidland A, Kientsch-Engel R, Nagy J. 2001. Nε-(carboxymethyl)lysine levels in patients with type 2 diabetes: role of renal function. *Am J Kidney Dis*, 38:785-791.

- (149) Wendt T, Tanji N, Guo J, Hudson BI, Bierhaus A, Ramasamy R, Arnold B, Nawroth PP, Yan SF, D'Agati V, Schmidt AM. 2003b. Glucose, glycation, and RAGE: implications for amplification of cellular dysfunction in diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol*, 14:1383-1395.

- (150) Wendt TM, Tanji N, Guo J, Kislinger TR, Qu W, Lu Y, Bucciarelli LG, Rong LL, Moser B, Markowitz GS, Stein G, Bierhaus A, Liliensiek B, Arnold B, Nawroth PP, Stern DM, D'Agati VD, Schmidt AM. 2003a. RAGE drives the development of glomerulosclerosis and implicates podocyte activation in the pathogenesis of diabetic nephropathy. *Am J Pathol*, 162:1123-1137.

- (151) Yan SD, Chen X, Schmidt AM, Brett J, Godman G, Zou YS, Scott CW, Caputo C, Frappier T, Smith MA, Gerry P, Yen SH, Stern D. 1994b. Glycated tau protein in Alzheimer disease: a mechanism for induction of oxidant stress. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91:7787-7791.

- (152) Yan SD, Schmidt AM, Anderson GM, Zhang J, Brett J, Zou YS, Pinsky D, Stern D. 1994a. Enhanced cellular oxidant stress by the interaction of advanced glycation end products with their receptors/binding proteins. *J Biol Chem*, 269:9889-9897.

- (153) Yan SD, Zhu H, Zhu A, Golabek A, Du H, Roher A, Yu J, Soto C, Schmidt AM, Stern D, Kindy M. 2000. Receptor-dependent cell stress and amyloid accumulation in systemic amyloidosis. *Nat Med*, 6:643-651.

- (154) Yeh CH, Sturgis L, Zhang XN, Sherwood SJ, Bjerkke RJ, Juhasz O, Crow MT, Tilton RG, Denner L. 2001. Requirement for p38 and p44/p42 mitogen-activated protein kinases in RAGE-mediated nuclear factor-kappaB transcriptional activation and cytokine secretion. *Diabetes*, 50:1495-1504.

- (155) Yoshihara K, Kiyonami R, Shimizu Y, Beppu M. 2001. Determination of urinary pyrroline by solid-phase extraction and high performance liquid chromatography. *Biol Pharm Bull*, 24:863-866.

- (156) Youssef P, Roth J, Frosch M, Costello P, Fitzgerald O, Sorg C, Bresnihan B. 1999. Expression of myeloid related proteins (MRP) 8 and 14 and the MRP8/14 heterodimer in rheumatoid arthritis synovial membrane. *J Rheumatol*, 26:2523-2528.
- (157) Zwadlo G, Bruggen J, Gerhards G, Schlegel R, Sorg C. 1988. Two calcium-binding proteins associated with specific stages of myeloid cell differentiation are expressed by subsets of macrophages in inflammatory tissues. *Clin Exp Immunol*, 72:510-515.

Anhang: Patientendaten, Messergebnisse, Laborparameter

Patienten- nummer	Eingangs- nummer	Geschlecht	Alter (Jahre)	Diagnose	Kreatinin Serum ($\mu\text{mol/l}$)	Kreatinin Urin ($\mu\text{mol/l}$)	Protein- urie (mg/l)
1	902324 / 02	männlich	68	AA	133	3,1	1706
2	101050 / 03	weiblich	75	AA	184	3,0	1428
3	900374 / 02	weiblich	67	AL	352	4,7	1525
4	900975 / 03	männlich	67	AL			
5	100921 / 03	weiblich	69	AL	400	7,0	1991
6	102149 / 03	weiblich	54	AL	164	3,3	1870
7	50053 / 98	männlich	40	DN	524	8,1	4469
8	50159 / 98	männlich	70	DN	397	9,4	1552
9	60429 / 99	männlich	48	DN	86	8,0	2037
10	602097 / 99	männlich	65	DN	233	5,2	3345
11	70325 / 00	weiblich	63	DN	207	3,7	4118
12	701044 / 00	männlich	77	DN			
13	800311 / 01	männlich	51	DN	131	5,7	834
14	800595 / 01	männlich	48	DN	168	9,5	1621
15	800708 / 01	weiblich	59	DN	290	4,9	5747
16	801064 / 01	männlich	58	DN	228	2,1	865
17	801264 / 01	männlich	64	DN	1026	6,2	5039
18	801281 / 01	weiblich	41	DN	363	4,0	2436
19	901068 / 02	weiblich	63	DN	335	8,8	9580
20	901900 / 02	männlich	67	DN	136	7,5	1209
21	902196 / 02	männlich	51	DN	287	10,3	573
22	903431 / 02	männlich	63	DN	208	10,8	9686
23	903626 / 02	männlich	72	DN	224	3,4	621
24	100324 / 03	männlich	55	DN	482	6,9	1878
25	102068 / 03	männlich	64	DN	176	6,3	111
26	102795 / 03	männlich	45	DN	86	3,2	490
27	103176 / 03	männlich	64	DN	177	6,0	588
28	A 7132 / 02	männlich	51	AA			
29	A 13281 / 01	weiblich	85	AA			
30	A 10233 / 97	weiblich	46	AA			
31	A 16062 / 00	männlich	71	AA			
32	A 5750 / 99	männlich	75	AA			
33	A 16672 / 96	weiblich	62	AL			
34	A 12853 / 01	männlich	51	AL			
35	A 2161 / 01	weiblich	49	AL			
36	A 19538 / 01	männlich	60	AL			
37	A 8222 / 95	männlich	69	AL			
38	A 8860 / 98	weiblich	49	DN			
39	A 2038 / 95	männlich	60	DN			
40	A 11082 / 00	männlich	70	DN			
41	A 1288 / 02	männlich	40	DN			
42	A 2327 / 01	weiblich	80	DN			
43	A 2447 / 02	männlich	67	DN			

Patienten- nummer	Albumin- urie (mg/l)	Proteinurie / g Kreatinin (mg/g)	Albuminurie / g Kreatinin (mg/g)	CML Serum (ng/ml)	CML Urin (ng/ml)	IMI Serum (AU/l)	IMI Urin (AU/l)
1	1180	4308	3454	128,6	299,77	0,52931	1,0491
2	783	1592	1018	219,5	335,01	0,66346	1,1048
3	880	3150	2114	387,1	251,72	0,9464	1,6203
4							
5	1420	5088	4299	907,1	750,02	1,1022	5,2147
6	1440	4184	3857	99,15	205,06	0,66082	0,56435
7	2750	4176	3169	267,9	363,53	1,2889	3,319
8	1180	1244	1164	705,1	449,5	0,93944	2,9294
9	1290	1983	1514	351,8	782,69	0,813111	4,2534
10	1760	4896	3162	336,3	294,62	0,17319	2,7238
11	2070	8566	5382	179,6	345,76	1,0464	4,0723
12							
13	559	1110	929	224,8	219,7	0,82125	3,0675
14	1160	1323	1172	193,8	263,3	0,65819	3,2879
15	7010	8729	13298	203,6	606,92	1,5723	4,2446
16	560	3147	2539	381,8	140,32	1,1166	0,56435
17	5380	7549	8061	334,7	1388,4	2,2148	5,9703
18	1380	4563	3177	269,2	413,77	1,0549	1,3527
19	4860	8287	5108	290,1	692,72	1,0222	3,6699
20	666	1231	815	255,3	383,62	0,66082	3,2571
21	420	434	369	526	351,61	1,0778	3,8816
22	6470	6801	5370	530,6	574,6	0,68987	3,0721
23	406	1390	1071	588,1	219,7	1,0194	1,6025
24	724	2094	954	610,2	430,88	1,0393	3,3938
25	67	141	85	355,1	324,53	1,2664	2,5355
26	338	1190	976	168,7	358,28	0,23306	1,7282
27	396	767	599	212	358,28	0,55901	1,669
28							
29							
30							
31							
32							
33							
34							
35							
36							
37							
38							
39							
40							
41							
42							
43							

Patienten- nummer	CML Tubulus- epithel	CML Endothel	CML Interstitium	CML Mesangium	IMI Tubulus- epithel	IMI Endothel	IMI Interstitium
1							
2							
3	positiv	positiv	positiv	negativ	positiv	positiv	positiv
4	positiv	positiv	negativ	negativ	positiv	positiv	
5							
6							
7	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv
8					positiv		
9	positiv	positiv	negativ	positiv	positiv	positiv	positiv
10	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv
11	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv
12	positiv	positiv	positiv	negativ	positiv	positiv	positiv
13					positiv	positiv	
14	positiv	positiv	negativ	positiv	positiv	positiv	negativ
15	positiv	positiv	positiv	negativ	positiv	positiv	positiv
16					positiv		positiv
17	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv
18	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv
19	positiv	positiv	negativ	positiv	positiv	positiv	negativ
20					positiv	positiv	positiv
21							
22							
23							
24							
25							
26							
27							
28	positiv	positiv	positiv	positiv			
29	positiv	positiv	negativ	positiv	positiv	positiv	positiv
30	positiv	positiv	negativ	positiv	positiv	positiv	positiv
31	positiv	positiv	positiv	negativ			
32	positiv	positiv	negativ	positiv	positiv	positiv	positiv
33	positiv	positiv	negativ	positiv	positiv	positiv	
34	positiv	positiv	negativ	positiv	positiv	positiv	
35	positiv	positiv	negativ	positiv	positiv	positiv	positiv
36	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv
37	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv	negativ
38	positiv	positiv	negativ	positiv			
39	positiv	positiv	negativ	positiv	positiv	positiv	positiv
40	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv
41	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv
42	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv
43	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv

Patienten- nummer	IMI Mesangium	RAGE Tubulus- epithel	RAGE Endothel	RAGE Interstitium	RAGE Mesangium	NFκB Tubulus- epithel	NFκB Endothel
1							
2							
3	positiv	positiv	negativ		negativ	positiv	positiv
4	negativ	positiv	negativ		negativ	positiv	positiv
5							
6							
7	negativ	positiv	negativ	positiv	negativ	positiv	positiv
8		positiv				positiv	
9	positiv	positiv	negativ	positiv	negativ	positiv	positiv
10	positiv	positiv	negativ	positiv	positiv	positiv	positiv
11	positiv	positiv	negativ	positiv	positiv	positiv	positiv
12		positiv	positiv	positiv		positiv	positiv
13	negativ	positiv	negativ		negativ	positiv	positiv
14	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv
15	positiv	positiv	negativ	negativ	negativ	positiv	positiv
16		positiv		positiv		positiv	
17	positiv	positiv	positiv	positiv	negativ	positiv	positiv
18	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv
19	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv
20	negativ	positiv	negativ	positiv	negativ	positiv	positiv
21							
22							
23							
24							
25							
26							
27							
28		positiv	negativ	positiv	negativ	positiv	positiv
29	negativ	positiv	negativ	positiv	negativ	positiv	positiv
30	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv
31		positiv	positiv	positiv	negativ	positiv	positiv
32	positiv	positiv	negativ	positiv	positiv	positiv	positiv
33	negativ	positiv	negativ		negativ	positiv	positiv
34	positiv	positiv	positiv	negativ	negativ	positiv	positiv
35	positiv	positiv	negativ	negativ	negativ	positiv	positiv
36	negativ	positiv	negativ	positiv	negativ	positiv	positiv
37	positiv	positiv	negativ	negativ	negativ	positiv	positiv
38		positiv	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv
39	positiv	positiv	positiv		negativ	positiv	positiv
40	negativ	positiv	positiv	positiv	negativ	positiv	positiv
41	positiv	positiv	positiv	positiv	negativ	positiv	positiv
42	negativ	positiv	negativ	positiv	negativ	positiv	positiv
43	negativ	positiv	negativ	positiv	negativ	positiv	positiv

Patienten- nummer	NFκB Interstitialium	NFκB Mesangium	MRP-14 positive Zellen (Anzahl/Sichtfeld)
1			
2			
3	positiv	negativ	35
4		negativ	93
5			
6			
7	positiv	positiv	72
8	negativ		34
9	negativ	negativ	69
10	positiv	negativ	49
11	positiv	positiv	107
12	negativ		36
13	negativ	negativ	34
14	positiv	positiv	45
15	positiv	negativ	111
16	positiv		45
17	positiv	positiv	118
18	positiv	positiv	99
19		negativ	38
20	positiv	negativ	81
21			
22			
23			
24			
25			
26			
27			
28	negativ	positiv	24
29	positiv	positiv	116
30	positiv	positiv	54
31	positiv	negativ	208
32	positiv	positiv	118
33		negativ	23
34		positiv	28
35	positiv	positiv	58
36	positiv	positiv	92
37	positiv	negativ	111
38	positiv	negativ	47
39	negativ	negativ	53
40	positiv	negativ	60
41	positiv	negativ	120
42	negativ	negativ	129
43		negativ	57

LEBENS LAUF

Persönliche Daten

Name	Friederike Bötticher
geboren am	16.12.1979
in	Zwickau
Anschrift	Poststraße 19, 08134 Wildenfels
Konfession	evangelisch
Familienstand	ledig

Schul Ausbildung

09 / 1986 – 07 / 1992	Grund- und Mittelschule Wildenfels
08 / 1992 – 07 / 1998	Käthe-Kollwitz-Gymnasium Zwickau
	Abschluss mit Abitur

Hochschulausbildung

10 / 1998 – 06/ 2005	Studium der Humanmedizin an der Friedrich-Schiller-Universität Jena
-----------------------------	--

Berufliche Tätigkeit

seit 10 / 2005	Ärztin in Weiterbildung in der Abteilung für Orthopädie und Unfallchirurgie des Klinikums Erlabrunn
-----------------------	--

Wildenfels, den 09.03.2006

DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die mich bei der Erstellung meiner Promotionsarbeit mit Rat und Tat unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. G. Stein für die Vergabe des Themas, die umfangreichen Literaturhinweise sowie die begleitende Unterstützung bei der Überarbeitung der Dissertation.

Ebenso möchte ich mich bei Herrn Dr. M. Rüster für die kompetente Hilfe bei theoretischen und praktischen Fragen, sowie die umfassende Betreuung bei der Anfertigung dieser Arbeit bedanken.

Frau Dr. S. Franke, Frau Thiel und Frau Lohr bin ich für die hilfreichen Hinweise bei der Durchführung des praktischen Teils der Arbeit zu Dank verpflichtet.

Für die mir entgegengebrachte Unterstützung weiterer Mitarbeiter der Klinik für Innere Medizin III, des nephrologischen Forschungslabors sowie von Mitarbeitern des Instituts für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin möchte ich mich ebenfalls bedanken.

Wildenfels, den 09.03.2006

EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönliche Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Prof. Dr. G. Stein, Dr. M. Rüster, Dr. S. Franke,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

und ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Wildenfels, den 09.03.2006